

НАЦИОНАЛНА ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКА СЛУЖБА

=====

**НАЦИОНАЛЕН ДИАГНОСТИЧЕН НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ИНСТИТУТ
“ПРОФ.Д-Р ГЕОРГИ ПАВЛОВ”- СОФИЯ**

**МИКОЛОГИЧНИ И
МИКОТОКСИКОЛОГИЧНИ
ПРОУЧВАНИЯ НА ЦАРЕВИЦА И
ПШЕНИЦА, ПРОИЗВЕДЕНИ В БЪЛГАРИЯ
В ПЕРИОДА 1995 – 2008**

СТ.Н.С. I СТ. Д-Р ЛИДИЯ ЦВЕТКОВА БОРИСОВА, ДВМН

ЧЛЕН НА ЕКСПЕРТНИЯ СЪВЕТ ПО ОЦЕНКА НА РИСКА КЪМ МЗ

**София
2009**

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение.....	4
II. Преглед на литературата.....	7
1. Общи сведения за микроскопичните гъбички и микотоксините.....	7
2. Микотоксини причиняващи патология при животните.....	14
2.1 Фузариотоксини.....	14
2.1.1 Трихотеценови микотоксини.....	16
2.1.2 Зеараленон.....	19
2.1.3 Фумонизини.....	22
2.2 Афлатоксини.....	27
2.3 Охратоксини	35
2.4 Как да се предпазим от микотоксините.....	40
III. Собствени изследвания.....	50
1. Цел и задачи.....	50
2. Материал и методи.....	51
3. Резултати.....	53
3.1 Микологични и микотоксикологични проучвания.....	53
3.1.1 Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на пшеница, реколта 1995 – 1999.....	53
3.1.2 Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на пшеница, реколта 2005.....	61
3.1.3 Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на царевица на зърно в периода, 2000 – 2004.....	67
3.1.4 Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на царевица на зърно в периода, 2005 – 2006.....	73
3.1.5 Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на царевица и пшеница на зърно, реколта 2007 – 2008 г.....	75
IV. Обобщение.....	79
V. Изводи.....	97
VI. Литературен указател	99

I. ВЪВЕДЕНИЕ

От особено опасните контаминанти на фуражите, срещащи се при естествени условия, се откроява групата на микотоксините – вторични метаболити на микроскопичните гъбички, отличаващи се с висока токсичност и разнообразно действие в организма на животните и човека. Микотоксините представляват значим екологичен и социално здравен проблем по целия свят.

Вниманието към микроскопичните гъбички, поразяващи фуражите и продуцираните от тях микотоксини се налага от факта, че дори ниските им нива мога да доведат до сериозни здравословни проблеми, вследствие имуносупресивният им ефект, репродуктивни смущения при продуктивните животни, а оттам до намалената продуктивност и големи икономически загуби.

У нас цялостни проучвания относно микологичния и микотоксикологичен статус на основните зърнени суровини – пшеница и царевица не са извършвани. България е в климатичен район, изключително подходящ за развитието на микроскопичните гъбички от род *Fusarium*, т.н. "полеви плесени", продуценти на фузариотоксините, характерни за умерените климатични райони на планетата, вещества с различно токсикологично и биологично въздействие. В този смисъл не трябва да се подценява и ролята на плесените от род *Aspergillus* и *Penicillium*, охарактеризирани като „складови плесени“, които при определени условия също могат да продуцират микотоксини, довеждащи до остро токсично, дори до канцерогенно действие. Това създава възможност токсични плесенни метаболити да се образуват, както по време на растежа на растението и зреене на зърното на полето, каквито са фузариотоксините – фумонизини, деоксиниваленол, зеараленон, така и в процеса на съхранение на добитото зърно – охратоксини, афлатоксини и др.

Взаимоотношенията между динамиката на развитие на различните видове токсични плесенни видове, паразитиращи върху зърнените растения и комплекса от фактори, които им въздейства вероятно е много сложен. През различни годишни периоди тези фактори са се променяли и се променят в настоящия етап, което води до видово разместване и преобладаване на един или друг вид токсични плесени, определящи и микотоксикологичната характеристика на зърнените фуражи.

Установяването и проследяването на микологичния и микотоксикологичен статус на основните произведени зърнени суровини за производство на комбинирни фуражи у нас – пшеница и царевица, се налага по следните обстоятелства:

- Промяна в глобалните климатични условия (Мишев и Мочурова, 2009), водещи до развитието на плесенни видове, с различна токсикологична характеристика и като резултат на това до контаминиране на зърнените суровини с широка гама микотоксини;

- Занижаване и не винаги правилно и ефективно провеждане на растително защитни мероприятия срещу паразитните гъбички по време на растеж и вегетация на растенията;

- Неправилни агротехнически мероприятия – предсеитбена обработка на семената с фунгициди, гъстота на растенията в посевите, подходящо и навременно торене и пр.;

- Неподходящи метеорологични условия по време на прибиране на зърното и ненавременното му съхранение;

- Разширяване на международната търговия с фуражни суровини, която създава предпоставка за замърсяване на фуражите в страни, в които реално няма необходимите климатични условия за развитие на определени токсигенни плесенни видове и до тяхното микотоксинообразуване (CAST, 1989, 2003).

Взривове от акутни микотоксикози при продуктивните животни са общо взето рядко явление в модерното животновъдство. Много по-важно е действието на ниските концентрации на микотоксини, често пъти в нива, които трудно се доказват при микотоксикологичните изследвания, но довеждат до хронични патологични прояви при животните или до остатъчни количества в добиваните хранителни продукти от тях, с риск за консуматора.

Изложените до тук факти подчертават необходимостта от извършването на изследвания за установяване на микологичния и микотоксикологичен статус на основните зърнени фуражни суровини, произведени у нас. Неизбежното въздействието на множество фактори както през периода на растеж на растението, така и по време на съхранение на зърното водят до продуцирането на един или няколко микотоксина, които безспорно се намесват в патологията на продуктивните животни.

В настоящият труд представяме нашите резултати от няколкогодишни проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на зърнените фуражи, период в които установихме нови данни относно възможността за продуциране на микотоксини, посочвани като нетрадиционни за нашите климатични условия. Не всички аспекти от разглежданите проблеми са засегнати, но си позволяваме да изкажем становището, че процесите на образуване на микотоксини във фуражите не са статични, а напротив, динамични и непредсказуеми. Само чрез въвеждането на постоянен контрол по отношение съдържанието на микотоксини в изхранваните фуражи може да се осъществи ефективна профилактика на микотоксикозите в модерното животновъдство. Проблемът има и социално здравно значение, тъй като остатъчните количества от микотоксини се откриват в продуктите от животински произход, което представлява реален риск за здравето на човека.

II. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

1. ОБЩИ СВЕДЕНИЯ ЗА МИКРОСКОПИЧНИТЕ ГЪБИЧКИ И МИКОТОКСИНИТЕ

Особено опасни контаминанти, които могат да се образуват по време на растеж, вегетация, зреене, прибиране и съхранение на зърнените фуражи са микотоксините, природни замърсители, представляващи социално здравен и екологически проблем на човечеството (Rutz and Etzel, 2002).

Проблемът за наличието на микотоксини във фуражите, независимо от това, че се третира от години наред, продължава да е от глобално значение. Натрупаните знания за тяхната токсичност (Peshin et al., 2002; Driehuis et al., 2008), често съпроводена с изразена канцерогенност, мутагенност и тератогенност, практически повсеместното разпространение на микроскопичните гъбички продуценти на тези токсични вещества, размера на причиняваните икономически загуби, поставя проблема за микотоксините извън рамките на интересите на отделните личности, лаборатории, институти и дори държави и ги превръща в глобален проблем на планетата, с които се занимават редица международни организации (СЗО, ФАО, Програмата на ООН за

околната среда, Международната агенция за изследване рака към СЗО, Международният съюз за чиста и приложна химия и др.)

На първата конференция по микотоксините в Найроби, Кения, през 1977 г. (Global perspective of mycotoxins) микотоксините бяха определени като замърсители с приоритетно значение за здравето на човека и животните и бяха начертани перспективи за научните изследвания в тази област. На втората конференция по микотоксинология в Бангкок (1987 г.) бе потвърдена важността на микотоксините, образувани от микроскопичните гъбички от род *Fusarium* – зеараленон и трихотецени, в т.ч. ДОН, Т-2 токсин, НТ-2 токсин и др. На тази конференция бе отбелязана и необходимостта от извършващо се пренасочване на научните изследвания от афлатоксините, към токсичните плесенни метаболити от род *Fusarium*.

“Тихи убийци, “невидими крадци”, “неизбежни замърсители”, “природни отрови”, това са част от характеристиките за микотоксините, представляващи сериозен екологичен и социално здравен проблем, както за целия свят, така и за Европа (Edwards et al., 1987; Jelinek, 1987; Roger, 1993; Vanyi et al., 1994, 1995; Yu et al., 2000; FAO, 2001; Logrieco et al., 2002; WHO, 2006; Shephard, G.S. 2008).

Не случайно Световната здравна организация (СЗО) обяви 2002 г. за борба с микотоксините. Само този факт е достатъчен за докаже важността на проблема -микотоксини. Макар, че те са известни на човечеството от дълбока древност, микотоксините са още по актуални днес.

До момента са известни над 250 вида микотоксини с подчертано токсични свойства по отношение на различни видове и категории животни (Hussein and Brasel, 2001).

2. КАКВО ПРЕДСТАВЛЯВАТ МИКОТОКСИНТЕ?

Микотоксините са токсични химични съединения с относително ниско молекулно тегло (М.т. 300-700), структурно многообразни вторични метаболити на плесенните гъби (Oswald et al., 2005; Bouhet ad Oswald, 2005;), често с ароматна, рядко алифатна химична структура (Turner et al., 2009). Малката молекула ги прави нечувствителни към факторите на околната среда. Микотоксините са стабилни съединения. Обработката на фуражите чрез смилане, гранулиране с пара, екструдирание, въздействието на високи и ниски температури, дезинфектанти и др., не намаляват риска от микотоксините поради тяхната термоустойчивост и стабилност по време на технологичния процес, което утежнява и прави почти невъзможно детоксикацирането на контаминираните храни (Scudamore and Banks, 2003; Scudamore et al., 2004, Scudamore, K.A. 2005). Малката им молекула не позволява разпознаването им от имунната система на организма и образуването на антитела (Bauer, J., 1982; Bouhet ad Oswald, 2005; Oswald et al., 2005).

Физико-химичните изследвания, направени на голяма част от микотоксините показват, че тези вещества могат да се отнесат в най-различни категории: те са или кумаринови производни, или спадат към сесквитерпеноидите, антрахинолите, пиперазините, пираните, бутенолидите, фенолните макролиди, алкалоидите, стероидите и др. Тези гъбични метаболити оказват своето разрушително действие на много системи от животинския организъм и предизвикват различни ефекти *in vivo*. Най-важните увреждащи свойства на микотоксините са: хепатотоксични, нефротоксични, кардиотоксични, дермoneкротични, канцерогенни, тератогенни и

имуносупресивни. Този многообразен начин на въздействие на микотоксините определя и широката им клинична симптоматика (Whitlow, L. 2005).

До настоящия момент са постигнати значителни успехи в изучаването на химичната структура, свойствата, метаболизма и механизма на действие на много микотоксини, като е изяснена и тяхната роля в етиологията и патогенезата на редица токсикози при животните и човека. Същевременно аналитичната химия и токсикологичната характеристика на известните микотоксини се разработват значително по-бавно и не могат да вървят в крак със скоростта на откриване на микотоксините (Борисова, Л., 2005).

3.КАКВО ПРЕДИЗВИКВАТ МИКОТОКСИНИТЕ?

Микотоксините предизвикват заболявания при селскостопанските животни и човека, наречени микотоксикози. Микотоксините и микотоксикозите са сериозен проблем за ветеринарната и за хуманната медицина. Повечето микотоксикози се характеризират с липсата на специфични клинични симптоми и не се поддават на лекарствена терапия. За тях липсват и специфични антидоти (Станкушев и Спесивцева, 1971). В зависимост от съдържащите се във фуражите микотоксини, продължителността на изхранване на контаминирания фураж, вида и физиологичния статус на животните, се наблюдават следните форми на микотоксикози:

1/ акутни микотоксикози – при хранене на животните с фуражи, съдържащи високи, над допустимите нива микотоксини за кратък период от време. Специфичните изменения се наблюдават в засегнатите органи и системи, предизвиквайки появяването на класически клинични признаци – хепатити, кръвоизливи, нефрити, некроза на устния и чревния епител и смърт (Борисова, Л., 2005).

2/ хронични микотоксикози –при приемането на умерени или ниски (подпрагови) концентрации на микотоксини, често трудно установими в практиката. Най-често те се характеризират със загуба на тегло, лошо оползотворяване на фуража, забавен растеж, ниска плодовитост и безплодие, аборт, ранна ембрионална смъртност, хиперестрогенизъм, респираторни проблеми, ненормално оперение при птиците, промени в космената покривка и дерматонекрози, недоимъчни състояния, намалена продуктивност, лошо търговско качество на продуктите и др. (Борисова, Л., 2005, Whitlow, L. 2005).

3/ вторични ефекти от микотоксикозите – състоят се предимно в потискане на имунитета, разстройства в механизма на устойчивост (особено в храносмилателния тракт) и се съпровождат от симптоми на съществуващите в момента заразни заболявания, поради което е много трудно да бъдат диагностицирани (Bennett and Klich, 2003).

Изследванията на Leeson et al., 1995 г с чисти микотоксини доказват, че главните органи-мишени, поразени от токсичните ефекти на афлатоксините, трихотецените, деоксиниваленола, зеараленона, охратоксина, фумонизините са белите дробове, черен дроб, бъбреците, репродуктивната система. Въпреки това наблюдаваната клинична симптоматика често пъти не е достатъчна за точна диагностика на микотоксикозите в условията на широката практика. Една от причините за това е, че много видове токсични плесени продуцират едновременно няколко микотоксина. Не без значение е и факта, че съществува междувидова разлика във възприемчивостта и клиничните признаци на отделните микотоксикози при животните.

4. КОЙ ПРОДУЦИРА МИКОТОКСИНТЕ?

Микотоксините са биологични замърсители, вторични метаболити на микроскопичните гъбички, резултат от обмяната на веществата, в процеса на размножаването им в субстрата (CAST, 2003).

Микроскопичните гъбички притежаващи токсични свойства принадлежат към групата на т.нар. несъвършени гъби (*Fungi imperfecti*), включващи повече от 25 000 описани вида. Несъвършените гъбички се различават от всички останали групи, както по броя на видовете, така и по своята непретенциозност към условията на растеж и развитие. Те са едноклетъчни или многоклетъчни, безхлорофилни микроорганизми, които се развиват като паразити или сапрофити, като отличителната им черта е бързият и обилен растеж. С малки изключения най-обща характерна морфологична особеност на гъбичките е мицелът – основно тяло, образувано от сплитане на множество хифи, които имат нишковидна форма, външна обвивка, разклонения и апикален растеж. Образуваният мицел е с обща повърхност, чрез която става поглъщането на хранителни вещества от разтвори чрез осмоза (Станкушев и Спесивцева, 1971; Pozzi et al., 1995).

Върху развитието на токсигенните видове гъбички, поразяващи фуражите и образуването на микотоксини влияят редица фактори между които основно значение имат температурата и влажността на околната среда, активната киселинност на почвата (pH), наличието на кислород, субстратите върху които се развивават, съпътстващата микофлора, спазване на основните агротехнически мероприятия и още ред други условия.

Към несъвършените гъбички, известни като продуценти на микотоксини спадат преди всичко тези от родовете *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachybotrys*, *Myrothecium* и др. (Bennett and Klich, 2003).

С най-голямо значение сред микотоксините като естествени замърсители на зърнените фуражи у нас са: фузариотоксините (зеараленон, дезоксиниваленол, HT-2 токсин, T-2 токсин) афлатоксините, охратоксините, стахиботриотоксина (Weckbach, 1977; Leeson et al., 1995; Zhang et al., 1997; Dewegovda et al., 1998; Barrett, 2000; Pitt, J.I., 2000; Eskola et al., 2001; Withanage et al., 2001; Womg et al., 2001; Etzel, 2002; Peshin et al., 2002, Bennett and Klich, 2003; Duarte-Vogel et Villamil-Jimenez, 2006; Krysinska-Traczyk et al., 2007; Li et al., 2008; Yin et al., 2008; Yu et al., 2008).

2. МИКОТОКСИНИ ПРИЧИНЯВАЩИ ПАТОЛОГИЯ ПРИ ЖИВОТНИТЕ

2.1 ФУЗАРИОТОКСИНИ

Фузариотоксините са токсични вещества, продуцирани от токсичните гъбички от род *Fusarium*.

Между всички известни микотоксини тези, които се образуват от представителите на род *Fusarium* се считат за основни замърсители на фуражите и фуражните суровини, главно от високата фузариозна поразеност на зърнените култури у нас, а също и в различни региони на света (Станкушев, Х., 1965, б; 1969; 1973; Димитров, М., 1980, Nelson et al., 1993; Grabarkiewicz-Szczesna et al., 2001).

Данните от последните десетилетия водят учените до заключението, че “токсичността на естествените продукти на *Fusarium* са с по-голямо разпространение и вероятно с по-голямо значение от това на афлатоксините” (Mirocha and Christensen 1974).

Микотоксините могат да се образуват през различни фаза на растеж и вегетация на растенията. Фузариумните видове, или т.н. “полеви плесни” притежават способността да се развиват изключително по време на растеж, по-специално при цъфтежа (Регламент 1126/2007 ЕС) и вегетацията на зърнените растения и да продуцират в тях токсични продукти, без да предизвикат видими признаци на оплесняване върху произведеното зърно. С това те се отличават от “складовите плесени”, които продуцират микотоксини изключително по време на съхранение на зърнената маса и по контаминираното зърно, често се наблюдават характерните признаци на оплесняване (Christensen, С.М. 1969; Трисвятский, Л.А. 1975; Surai and Dvorska, 2005).

Гъбичките от род *Fusarium* се срещат като сапрофити в почвата или като паразити по дивите и културни растения, като продуцират голям брой различни микотоксини от класа на трихотецените (Т-2 токсин, НТ-2 токсин, деоксиниваленол /DON/), зеараленона и фумонизините (Smith and Solomons, 1994). Тези плесенни видове са широко разпространени, както в северните и южните райони на планетата – в Америка, Европа и Азия, така и в страните с умерено – континентален климат, в който попада и България. В нашата страна съществуват изключително благоприятни климатични условия за продуцирането на фузариотоксини и те се явяват основни замърсители на храните за животните и човека (Станкушев, Хр. и Н. Спесивцева, 1971; Борисова, Л., и кол. 2000, Борисова, Л., 2005). Най-често замърсени с тях са зърнените култури – пшеница, царевица, ечемик.

Условно фузариотоксините могат да бъдат разпределени на 3 групи:

- **трихотеценови микотоксини**
- **зеараленон и сродните му съединения;**
- **фумонизини.**

Тези фузариотоксини са пространени в световен мащаб по зърнените култури, фуражните инградиенти и комбинирани фуражи (D’Mello, 1999; Danicke et al., 2005, 2008). Фузариотоксините са съединения с различна химична структура, с разнообразно биологично и токсикологично значение, както за здравето на продуктивните животни, така и здравето на човека.

Характерно за зърнените фуражи произведени у нас за последните години, са високите нива на обсеменяване с плесенни видове от род *Fusarium*. Данните от микологичните проучвания показват, че видовете *F. graminearum* и *F. triseinctum* преобладават при пшеницата, а *F. moniliforme* и *F. graminearum* – при царевицата (Борисова, Л., 2005).

2.1.1. ТРИХОТЕЦЕНОВИ МИКОТОКСИНИ

В настоящия момент са известни повече от 60 трихотеценови съединения, вторични метаболити на микроскопичните гъбички от род *Fusarium*.

По своята химична природа се класифицират на макроциклични (Yike et al., 1999; Charpin-Kadouch et al., 2006) и немакроциклични съединения, в зависимост от присъствието на макроцикличен естер или връзка между C₄ и C₁₅ (Chu, F.S. 1998). Те съдържат основно ядро от три пръстена, наречено трихотекан. Тъй като всички трихотеценови микотоксини съдържат епоксиден

пръстен при C-12:13 и двойна връзка при C:9-10, цялата група е получила названието 12,13 – епокситрихотецен – 9-ени (McLaughlin et al., 1977; Jarvis and Mazzola, 1982; Ueno, 1983; Peraica et al., 1999). Някои от физичните им свойства са отразени на табл.2.

В зависимост от структурата на трихотеценовото ядро тези микотоксини се разделят на: тип А, тип В, тип С и тип Д. Най-голямо значение от токсикологична гледна точка имат токсините от тип А и В. Трихотеценовите съединения от тип А и В и видовете гъбички, които ги продуцират (Борисова, Л., 2005) са отразени на табл.1.

Табл.1. Трихотецени от тип А и В и видовете гъбички, които ги продуцират (Борисова, Л. 2005)

Трихотецени	Видове гъбички
Тип А	
T-2, HT-2, DAS, NS	Fusarium tricinctum F. sporotrichoides F. poae F. acuminatum
DAS	F. equiseti F. semitectum
Тип В	
DON, 3-AcDON	F.graminearum
NIV, F-X	Gibberella zeae (анаморф.)
DON, 3-AcDON	F. culmorum
Trichotecin	Trichothecium roseum

От всички трихотеценови фузариотоксини само 6 са доказани като естествени замърсители в хранителни продукти и зърнени фуражи: Т-2 токсин, диацетоксицирпенол, ниваленол, HT-2 токсин, фузаренон Х, деоксиниваленол. Трихотеценовите фузариотоксини представляват сериозна опасност за селскостопанските животни. Обикновено, микотоксикозите, причинени от тях протичат хронично, като болестни състояния с неизяснена етиология и големи икономически загуби (Brake et al., 2000).

От извършените микотоксикологични изследвания на основните зърнени култури – пшеница и царевица у нас, в периода 1995-2005, е установено, че фузариотоксина деоксиниваленол, като представител на трихотеценовата група микотоксини е един от основните контаминанти и се продуцира от вида *Fusarium graminearum* (Борисова, Л., 2000, Танков, Д., 2000 и Вълчева, А., 2002).

Характерно за зърнените фуражи произведени у нас за последните години, са високите нива на обсеменяване с плесенни видове от род *Fusarium*. Данните от микологичните проучвания показват, че видовете *F. graminearum* и *F. triseinctum* преобладават при пшеницата, а *F. moniliforme* и *F. graminearum* – при царевицата (Борисова, Л., 2005).

Деоксиниваленолът е доказан като замърсител у нас в пробите пшеница до 1150 ppb, а за царевица 980 ppb. Установените нива на микотоксина и наблюдаваните случаи от практиката на намалена продуктивност, повишена заболяемост при определени видове и категории животни, показват, че този микотоксин става приоритетен за страната и все по- често се намесва в патологията на продуктивните животни.

Процесът на токсинообразуване е сложен и е резултат от действието на комплекс условия, включващи генетичния потенциал на вида *F.graminearum*, климатогеографските условия на зърнопроизводителните райони, агротехниката, в т.ч. използването на подходящи сортове зърнени фуражи, преосеитбена обработка на семената, използването на хербециди и др.

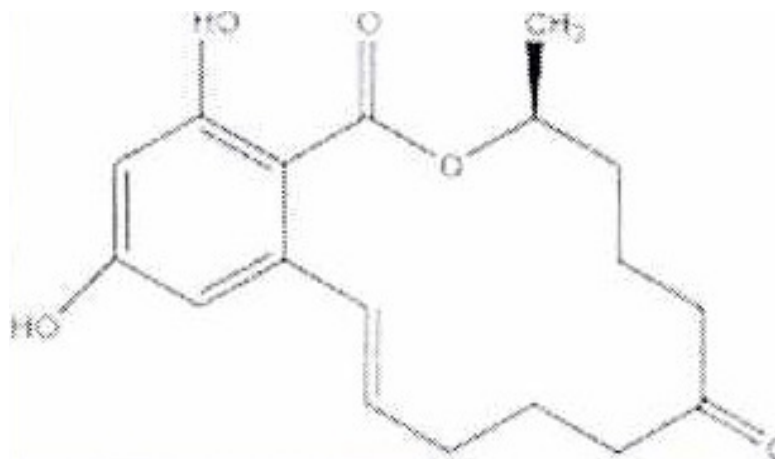
Взаимоотношенията между видовете фузариуми, динамиката на тяхното развитие и комплекса от фактори, които им влияят, вероятно е много сложен. През различните години тези фактори безспорно са се променяли, което води до разместване или преобладаване на един или друг вид фузариум, а от там и на микотоксикологичния статус на добитите зърнени култури. В исторически план токсикозите при животните и човека, предизвикани от храни, съдържащи трихотеценови микотосини, се отнасят към най-разпространените и най-често описваните микотоксикози (Chu, F.S. 1997).

2.1.2 ЗЕАРАЛЕНОН

Историята по откриването на заболяването (*Intoxicatio cum zeara/enono*) води началото си от 1927 г. Основните симптоми са вулвовагинитите и във всичките случаи е свързано с храненето с фураж (предимно царевица и ечемик), оплесенен с *Fusarium graminearum* (*F. roseum*). През 1962 г. група учени доказват, че щам на *F. graminearum* продуцира анаболно утеротропно съединение – зеараленон, проявяващо естрогенното си действие при всички видове животни (Bacon et al., 1977; Christensen et al., 1988; Malekinejad et al., 2006). В най-новите литературни данни се подчертава, че зеараленона има още хепатотоксично, хематотоксично, имунотоксично и генотоксично действие. По-късно токсинът е изолиран от царевица, заразена с *F. graminearum* (понякога и *F. tricinatum*), и експериментално е доказано, че продуцира заболяване по свинете.

По своята структура зеараленонът (фиг.3) е лактон на резорциловата киселина. Продуциран при естествени условия, той има трансконфигурация, емпиричната му формула е C₁₈H₂₂O₅, а молекулното тегло - 318.

Фиг.3 Структурна формула на зеараленон



Той е бяло, кристално вещество, слабо разтворимо във вода и неразтворимо в серовъглерод и тетрахлорметан. Разтворим е в метанол, етанол, ацетонитрил, ацетон, бензол, п-хексан; точка на топене 164-165⁰С. Има 3 максимума на поглъщане в разтвор на етанол в спектъра на УВ светлина – при 236 nm (E = 29 700), при 274 nm (E = 13 909) и при 314 nm (E = 6020). Зеараленонът е стабилно съединение както при съхранение, така и при преработка на съхраненото зърно и не се разгражда при висока температура. При мокро смилане на царевичата той се концентрира в глютенната фракция. Зеараленонът и неговите производни имат синьо-зелена флуоресценция при УВ облъчване (360 nm). Интензивността на флуоресценцията се повишава при облъчване с ултравиолетова светлина с дължина на вълната 260 nm – променя се в зелено.

В естествени условия токсинът се среща като замърсител на зърнените култури (Campbell and Armstrong, 2007; Thieu et al., 2008). Значителни количества от него се натрупват в царевичата, ечемика, овеса, соргото и различните видове фуражи в Европа, САЩ, Канада, Австралия, Индия, Япония, ЮАР, Океания. Често зеараленонът присъства заедно с други трихотеценови микотоксини – Т-2 токсин и деоксиниваленол, тъй като те се продуцират от една и съща гъбичка (*F. graminearum*), поразяваща растенията още на полето, в процеса на тяхното развитие. Обикновено образуването на микотоксини в зърното се свързва с “розовото оцветяване на класа”, загниване на корена и стъблото. Синтезирането на тези микотоксини в царевичата, пшеницата и пр. може да стане както в периода на вегетация, така и по време на съхранение на зърното, ако влажността е над допустимата. Редуващите се високи и ниски температури по време на зреене и прибиране на зърнените култури може също да предизвика натрупване на зеараленон.

У нас проучвания върху разпространението на зеараленон-продуциращи микроскопични гъбички от род *Fusarium* са извършени от Станкушев и сътр. (1977) и от М.Димитров и сътр.(1982). Първият колектив е изучавал разпространението на видовете фузариуми по царевичата и способността им да образуват токсични вещества. От изолираните 12 вида и разновидности от род *Fusarium* продукция на зеараленон е била доказано основно при видовете *F.graminearum*, *F.sambucinum*, *F.heterosporum*, *F.avenaceum*. Димитров и сътр.(1982) проследяват зеараленовата продукция при 163 щамове от род *Fusarium*, изолирани от проби царевича, пшеница и фасул. При 66,9% от изолираните щамове се доказва продуциране на зеараленон. Като основни продуценти се считат *F.graminearum*, *F.gibbosum*, *F.moniliforme*, *F.solani* и др.СЗО (1982) посочва видовете *F.graminearum*, *F.tricinctum*, *F.oxysporum*, *F.sporotrichoides* и *F.moniliforme* като основни продуценти на зеараленон.

Попова (1984) проучва микроскопичните гъбички от род *Fusarium*, продуциращи зеараленон поразяващи пшеницата, царевичата и фасула и факторите влияещи върху неговата продукция. Като основни продуценти на зеараленон при пшеницата и царевичата се доказва вида *F.graminearum*. Дончева (1988) проучва съдържанието на зеараленон в царевича и царевично брашно и изпитва зеараленон - образуващата способност на изолираните щамове *Fusarium*.Танков (2000) проучва съдържанието на зеараленон и деоксиниваленол в пшеница и царевича, продуцирани от микроскопични гъбички от род *Fusarium* и доказва, че видът *F.graminearum* е основен продуцент на фузариотоксина зеараленон. Въз основа на посочените данни от цитираните автори става ясно, че фузариотоксинът зеараленон присъства почти винаги като кантаминант в пшеницата и царевичата, респективно във фуражите

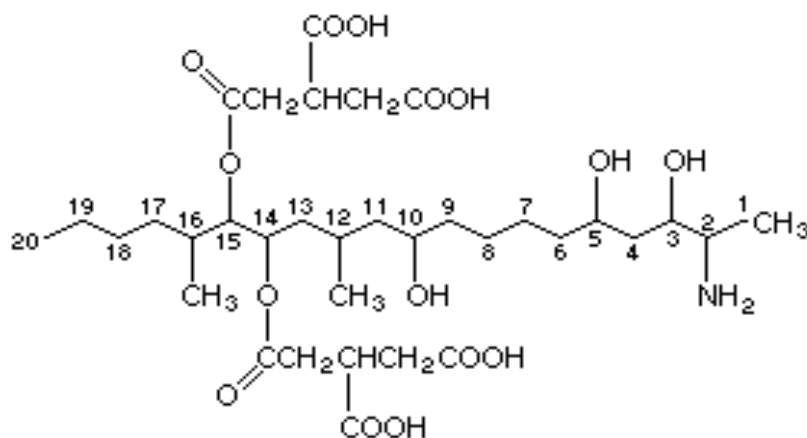
произведени у нас и безспорно има отношение в патологията на продуктивните животни, особено при свинете.

2.1.3 ФУМОНИЗИНИ

В продължение на много години редица изследователи са наблюдавали заболявания при различни видове животни, с клиника на микотоксикоза, свързана с изхранването на фуражи, оплесенени от гъбичката *F. moniliforme*, но те не са допускали съществуването на точно определен токсин. Други автори са приемали, че тези токсикози, проявяващи се с различни патологоанатомични промени, са в резултат на комбинираното действие от няколко токсина.

Фумонизините структурно са определени през 1988г. от Bezuidenhoud, S.C., като нискомолекулни водноразтворими съединения (за разлика от всички досега доказани микотоксини) (Борисова, Л., 2005). Те са нова група микотоксини, изолирани и пречистени от култура на *Fusarium moniliforme* (Gelderblom et al., 1988; Борисова, Л., Т. Тачева. 1999; Marasas et al., 2001; Борисова, Л., 2005; Piva et al., 2005), които се образуват основно по време на зреене и вегетация на зърното (Борисова, Л. и кол. 2004).

Химически те представляват един алифатен въглеродород с една крайна amino- група и две трикарбоксилно- киселинни вериги (фиг.4).



Фиг. 4 Структурна формула на фумонизин В₁

Токсините са класифицирани като фумонизин В1 (FB1), фумонизин В2 (FB2) или фумонизин В3 (FB3), според номера и мястото на хидроксилните групи. Фумонизините са добре разтворими във вода, което ги отличава от всички останали микотоксини. Това се дължи на факта, че те нямат в молекулата си ароматни ядра. По химична структура те се отнасят като първични амини (Murphy, P. et al., 2006).

Фумонизините са термоустойчиви и резистентни към алкални разтвори, прилагани за инактивирането на много други обикновени микотоксини. Молекулното тегло на FB1 е 721.

По данни на Международната агенция за изучаване на рака, тези фузариотоксини, заедно с афлатоксините, се причисляват към групата на канцерогенните вещества с особено значение за селскостопанските животни и представляват голям риск както за здравето на животните, така и за здравето на

човека (Rheeder et al., 1992; Bennett, J.W. and Klich, M., 2003; Soriano et al., 2005, Missmer et al., 2000, 2006; Cavret, S. and Lecoeur, S. 2006). Понастоящем са установени фумонизини B1, B2, B3, A1 и A4.

В естествено оплесенено царевично зърно с *F. moniliforme* съотношението между FB₁ и FB₂ е приблизително 1:8, а между FB₁ и FB₃ е 1:12 (Борисова, Л., 2005). Фумонизин B1 е най-силно токсичен и сравнително най-добре проучен. Продуцент на фумонизините е микроскопичната гъбичка *F. Moniliforme*, която е широко разпространена в природата и се явява естествен контаминант на всички зърнени фуражи в различните географски ширини. Фумонизините от група B (B₁, B₂, B₃) според Nelson et al. (1993) и Sydenham et al. (1991) също са най-често срещаните в природата естествени контаминанти (Taranu et al., 2005; Keck & Bodine, 2006; Constable et al., 2003) на царевичната и просото.

Продуценти на фумонизините са микроскопичните гъбички от род *Fusarium*: *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium anthophilum*, *Fusarium dlamini*, *Fusarium nygamai* (ЕНС, 2000; NTP, 1999; Bacon et al., 2001; Marasas et al., 2001; Rheeder et al., 2002; Grosjean & Barrier – Guillot, 2004; Shephard et al., 1996; Nikiema et al., 2004; Samapundo et al., 2005, 2007; Arino et al., 2007).

Най-често са обсеменени царевичната (бяла и жълта) и соргото в топлите райони на планетата; те се явяват благоприятен субстрат за продуциране на фумонизините. Гъбичката може да се открие в почвата, растителните отпадъци, и корените на растенията, където запазва жизнеността си повече от 12 месеца при влажност 5-35% и температура на околната среда от 5 до 10⁰С. Доказано е, че голям процент (87-88%) от шамовете *F. moniliforme*, изолирани от царевича и сорго са силно токсични. При изучаване на факторите влияещи върху образуването на фумонизини при естествени условия е установено, че сушата по-време на растеж на царевичното растение последвана от по-студени, влажни условия по време на цъфтеж и развитие на зърното подпомагат синтезирането на токсина.

При проведените микологични и микотоксикологични проучвания у нас от Л. Борисова на царевича-зърно, реколта 2000, 2001 и 2002г. бе потвърдено, че видът *F. Moniliforme* се явява основен контаминант на тази зърнена култура при нашите климатични условия. Установено бе също, че между 60- 72% е обсеменяването с този плесенен вид. Чрез тези изследвания се доказано присъствието на тази нова група фузариотоксини и бе установено, че фумонизините се явяват естествен замърсител на царевичната и царевичните продукти в количества вариращи от 0,3 до 1,6 ppb (Борисова, Л., 2005). В нашата страна проучванията върху биологичното действие на фумонизините върху продуктивните животни са в начален етап. Установените количества на фумонизини в царевичната, вероятно играят съществена роля в патологията при свинете и птиците, и със сигурност са една от причините за наблюдаваните случаи на неблагоприятния изход в практиката, свързани с участието на микотоксините.

Фумонизините са силни имуносупресори. Те притежават и канцерогенни свойства. Предизвикват рак при експериментално третирани плъхове и мишки. При фумонизините не са доказани мутагенни свойства.

Доказано е, че фумонизините сериозно увреждат здравето на хората и животните (Prelusky et al., 1996; Gelderblom et al., 1988; Harrison et al., 1990; Bucci et al., 1996; Park et al., 1996; Miller, J., 2001; Bird et al., 2002; Sewram et al., 2003; Marasas et al., 2004; Bouhet et al., 2004; Petrinc et al., 2004) и са

предразполагащ фактор за развитието на инфекциозни заболявания (Oswald et al., 2003).

Ефектите им върху човека са неизяснени, но епидемиологичните данни предполагат, че консумацията на замърсена с фумонизини царевича допринася за развитие на рак на хранопровода в Южна Африка и Китай (Voss et al., 2001; 2006), а тяхната имунотоксичност е в процес на активни проучвания (Bondy and Pestka, 2000).

Най-чувствителни към действието на фумонизините са еднокопитните (конете), свинете, птиците, преживните и маймуните.

При конете предизвикват заболяването лейкоенцефаломалация. Ниски нива на този токсин водят до слаби хепатотоксични промени, но се наблюдават съществени патологоанатомични промени в мозъчната тъкан. Доказано е, че дори ниските концентрации (от 5 до 8 ppm) в дневната дажба на конете представляват реален риск за развитие на конска лейкоенцефаломалация, с остър токсичен ефект, завършващ летално.

При свинете фумонизините предизвикват белодробен едем, който се наблюдава само при този вид животни. При много ниски нива на токсина не се развиват клинични признаци, а при високи се наблюдава бърза смърт. Патологоанатомичните промени в този случай са съсредоточени в белия дроб-едем и хидроторакс. Свине, приемали храни, съдържащи около 0,1 ppm фумонизин В₁ в продължение на 5-10 дни, развиват признаци на пулмонарен едем и чернодробна цироза.

При пилета бройлери фумонизин-токсикоза се характеризира с подчертана имуносупресивност и повишена заболяемост.

Клинични признаци: В по-новата научна литература определено се счита, че изхранването на фуражи, силно оплесенени от гъбичката *F.moniliforme* и съдържащи фумонизини в различни количества, може да доведе до появата на лейкоенцефаломалация при конете, пулмонарен едем при свинете и заболявания при птиците.

2.2 АФЛАТОКСИНИ

За афлатоксините като причинител на токсикози, се появява съобщение след първото наблюдавано тежко заболяване с неизяснена етиология в Англия, причинило смъртта на повече от 100 хиляди птици през 1960 г., вследствие изхранването на бразилски шрот (Blout, W.P.1961, Goldblatt, L., 1969). Следват публикации за подобни заболявания при свине и телета, свързани с хранене на фъстъчен шрот, контаминиран с микроскопичната гъбичка *Aspergillus flavus*. По-късно е бил изолиран и токсичния агент афлатоксин, получил наименованието си от гъбичката. Следват редица съобщения за наличието на афлатоксини във фуражи в почти всички страни на света- Англия, САЩ, Франция, Русия, Индия, Чехословакия. Афлатоксините като замърсител на вносен фъстъчен шрот (индийски), бяха доказани и у нас (Станкушев и Спесивцева, 1971).

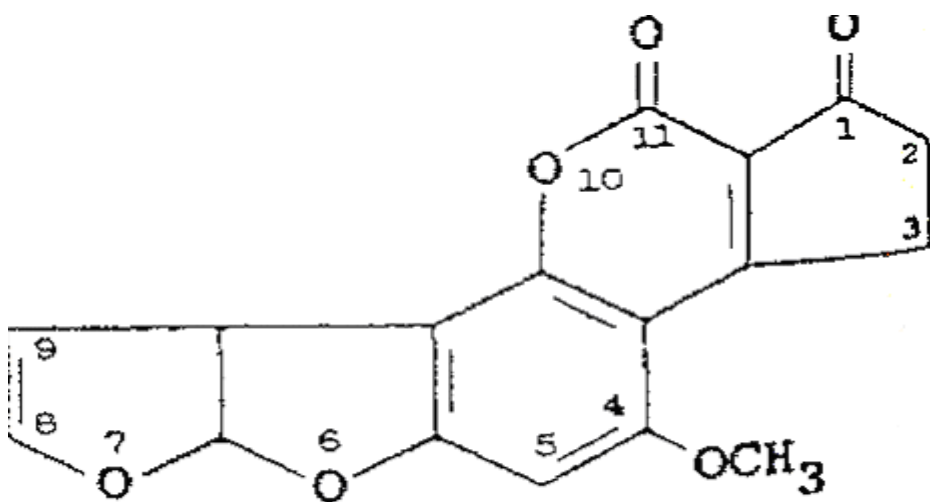
Семейството на афлатоксините включва повече от 18 съединения, като 4-те са основните представители- В₁, В₂, G₁, G₂, (Bennett,J.W., M.Klich, 2003), а другите се явяват производни или метаболити на основната група- афлатоксин М₁, М₂, В_{1а}, G_{2а} и пр.

По своята химична природа афлатоксините представляват фурокумарини. Афлатоксините притежават способността да флуоресцират под въздействие на ултравиолетовите лъчи и това им свойство лежи в основата на всички физико-

химични методи за доказване и количественото им определяне (Bennett, J.W., M.Klich, 2003).

Афлатоксините, които флуоресцират в синьо, се означават като фракции В₁ и В₂, а тези, които флуоресцират в жълто-зелена светлина, се определят като фракции G₁ и G₂. Тези съединения са слабо разтворими във вода, неразтворими в неполярни разтвори и лесно разтворими в средно полярни разтвори като метанол, хлороформ, диметилсулфоксид. Те са относително нестабилни в химически чист вид и чувствителни към действието на светлината, особено към ултравиолетовите лъчи. Разтворите им в хлороформ и бензол са стабилни в продължение на няколко години на тъмно и хладно. В сравнение с бактериалните токсини, афлатоксините са нискомолекулни съединения, благодарение на което те са устойчиви и не се разрушават в процеса на технологична обработка на заразените субстрати. Не се унищожават и при обработка с пара, гранулиране, сушене, силажиране, сенажиране, както и при продължително съхранение; устойчиви са на действието на киселини и основи. Пълното им разрушаване може да стане само след обработка с амониак или натриев хипохлорид (Дилов, П., 2005).

Афлатоксин В₁ (фиг.5) се явява най-силно токсичния метаболит и обикновено се синтезира в най-голямо количество, а афлатоксин G₂ , в най-малко. Редица автори съобщават за условията, при които започва образуването на афлатоксини, като подчертават значението на субстрата, наличието на аминокиселини в него, влагата, аерацията, технологията на обработка и начините на съхранение



Афлатоксин В₁

Фиг.5 Структурна формула на афлатоксин В₁

Продуценти на афлатоксините могат да бъдат микроскопичните гъбички от видовете *Asp. flavus* и *Asp. parasiticus* (Hicks et al., 2002; Otim et al., 2005; Hedayati et al., 2007; Pandey and Chauhan, 2007; Meissonnier et al., 2008). Съотношението между концентрацията на отделните афлатоксини В₁, В₂, G₁, G₂, варира значително и зависи изключително от щам продуцент и от субстрата. Повечето от токсичните щамове на вида *Asp. flavus* продуцират основно афлатоксин В₁ и G₁. Редица щамове могат да продуцират и 4-те

основни метаболита, а някои само афлатаксин В₁ и М₁. Способността да продуцират афлатоксини от 20 до 98% притежават предимно щамове на *Asp. flavus*, изолирани от различни видове субстрати.

Повсеместното разпространение на видовете от род *Aspergillus*, обяснява значителните мащаби на контаминиране на хранителните продукти и фуражи с тези плесени. В значителна степен нивото на заразеност с афлатоксини зависи от географските и сезонните фактори, условията на отглеждане, прибиране и съхранение на селскостопанските култури. До скоро се считаше, че афлатоксините са приоритетни за страните с тропичен и субтропичен климат. Сега се приема, че могат да се продуцират и в други географски области, с изключение на най-студените райони в света- Северна Европа, Канада и др.

Asp. flavus се отнася към мезофилните микроскопични гъбички и може да се развива при температура от 6-8⁰С до 44-46⁰С. Оптималната температура за образуване на афлатоксини е между 27- 30⁰С, но синтез на токсини може да се извърши и при значително по-ниска (12-13⁰С) или по-висока (40-42⁰С) температура.

Друг важен фактор, определящ растежа на *Asp. flavus* и синтеза на афлатоксини, се явява влажността на субстрата и атмосферния въздух. Обикновено при влажност над 18% се установява максимален синтез на афлатоксини при субстрати богати на въглехидрати (пшеница, ечемик, ръж, овес, царевица, ориз, сорго), а при 9- 10% влажност - при субстрати с високо съдържание на мазнини (фъстъци, слънчоглед, семена на памук, орехи), при относителна влажност на въздуха 97- 99%. При относителна влажност на атмосферния въздух под 85% синтезата на афлатоксини се преустановява.

Зърно, което е контаминирано още на полето с *Asp. flavus*, при съхранение с влажност над 15% се явява благоприятен субстрат за продуциране на афлатоксини. В тези случаи при гъбичното дишане и развитие се използва кислород, а при наличието на въглехидрати в зърното се формира въглероден двуокис и вода. Тази т.нар. допълнителна “несвързана” вода стимулира гъбичния растеж, а оттам и токсинообразуването.

Стресът от суша по време на растеж и вегетация на зърното се явява също като предпоставка за продуциране на афлатоксини (Withlow, L.W., 2005), от една страна, чрез съхранение на спорите на *Asp. flavus*, а от друга, чрез намаляване на механичните бариери, нарушаващи целостта на защитните обвивки на зърното. Уврежданията от инсекти или механични повреди по време на прибиране и съхранение на зърното също водят до увреждане на обвивката на зърното и позволяват гъбичката да използва карбохидратите от ендосперма на зърното, като субстрат при благоприятни условия за развитие - влага и температура.

При различните видове животни чувствителността към афлатоксините варира, при което LD₅₀ (mg/kg м.) е в границите от 0,3 до 17,9 mg/kg м., а черният дроб е основният прицелен орган (табл.6).

Според Patterson, (1982) и Тутельян и Кравченко (1985) видовата чувствителност на животните може да бъде свързана с различната скорост на метаболизиране на афлатоксините. От птиците висока чувствителност проявяват пуйките, патиците, гъските, следвани от пъдпъдъците, фазаните и кокошките (Rauber et al., 2007). От селскостопанските животни най-чувствителни към действието на афлатоксините са свинете (на възраст от 1 до 4 месеца) и телетата. Микотоксините притежават изразени кумулативни свойства. Например токсичността на афлатоксин В₁ се увеличава при многократно постъпване в организма в сравнение с останалите афлатоксини той е по-

токсичен. При опити с патета, третирани 7 дни, е установено, че LD_{50} за афлатоксин B_1 е 18,2, за B_2 – 54,8, за G_1 – 39,2, за G_2 – 175,5.

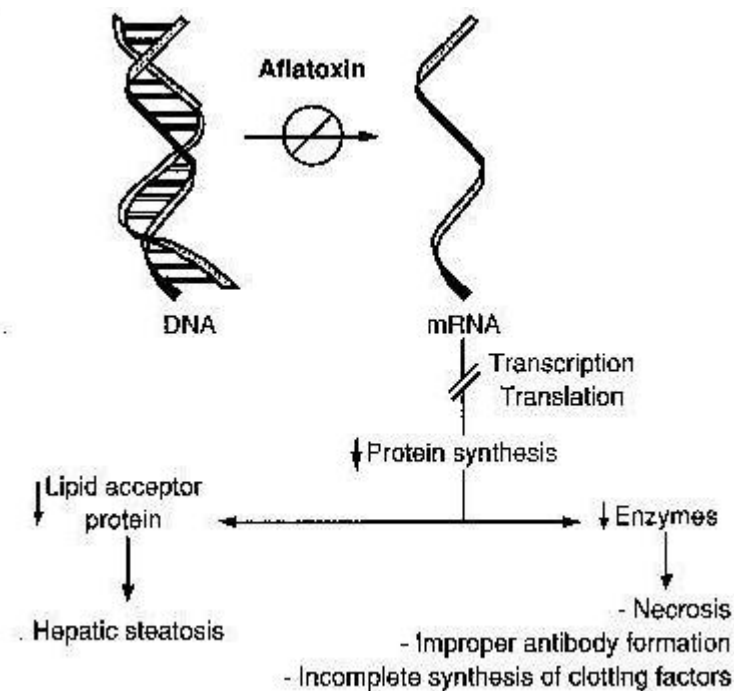
От практическа гледна точка трябва да се знае, че устойчивостта на микроскопичните гъбички, продуценти на афлатоксини е значителна. Така например, доказано е, че жизнеспособността на *Asp. flavus*, дори при добре изсушена царевича на зърно (заразена в природни условия по време на растеж и вегетация) се съхранява в продължение на 5-6 години. Наличие на афлатоксини, продуцирани в царевича, се доказват и след 10 годишно съхранение (Борисова, Л., 2005).

Действието на афлатоксините върху живия организъм може условно да се определи в две направления: остро токсично действие и отдалечени ефекти. При изучаване на афлатоксикозите при продуктивни животни, а също и от многото експериментални данни за различни видове животни, убедително се доказва, че афлатоксините се явяват едни от най-силните хепатотропни отрови, притежаващи и канцерогенни свойства (Abdel-Wahab et al., 2008; Meissonnier et al., 2008). Днес, се счита, че почти всички бозайници, птици и риби, както и висшите растения, са чувствителни към токсичното действие на афлатоксините (Toulah et al., 2007).

Според Osweiler (1996), механизмът на токсичното увреждане на афлатоксините е свързан с инхибиране на протеиносинтезата, чрез моделиране шаблона на ДНК и потискане синтеза на иРНК. Афлатоксините взаимодействат с молекулата на ДНК, като променят матрицата ѝ. Не е изключена възможността за пряко влияние на афлатоксините върху ензимите, участващи в синтеза на нуклеиновите киселини.

Нарушената протеиносинтеза, от своя страна, смущава образуването на ензими, необходими за енергийния метаболизъм и липидната мобилизация (фиг.2).

Афлатоксините оказват пряка влияние върху лизозомите чрез увреждане на мембраните и освобождаване на активните хидролази; Уврежда се и пропускливостта на плазмената мембрана. Всички посочени нарушения в клетъчните органели водят до т.нар. метаболитен хаос и гибел на клетката.



Фиг.6 Механизъм на действие на афлатоксините

Афлатоксините и метаболитите им намаляват *антитялообразуването*, т.е. те имат имunosупресивно действие и понижават резистентността на животните към инфекции (Shephard et al., 2008). Трябва да се отбележи, че понижението на съпротивителните сили на организма, дори от минимални количества от афлатоксини във фуражите, има много по-голямо значение за здравето на животните, отколкото острият афлатоксикоза. Афлатоксините се явяват мощни имunosупресори и повлияват както клетъчния и хуморалния имунитет, така и факторите на неспецифична защита на организма.

Афлатоксините проявяват *хепатоканцерогенно действие*. То се отличава от действието на други хепатоканцерогенни вещества по следните особености: възможност за развитие на раково заболяване, не само при продължителен прием на малки дози токсин, но и при еднократен прием на висока доза; развитието на тумора не се предшества от цироза; хепатоцелуларния карцином се развива на фона на съществуваща билиарна пролиферация.

Най-важната характеристика от действието на ниските дози е отдалеченото проявяване на хепатоканцерогенния ефект във времето и продължителността на латентния период, в зависимост от живота на дадения биологичен вид.

От продуктивните животни най-чувствителни към действието на афлатоксините са свинете (на възраст от 1 до 4 месеца) и телетата. От птиците висока чувствителност проявяват пуйките, патиците, гъските, следвани от пъдпъдците, фазаните и кокошките.

3. ОХРАТОКСИНИ

Охратоксикозите са известни още през 20-те години на миналия век. В основата на тези заболявания са предимно пораженията в бъбреците. За 1-ви път Larsen (1928), прави връзка между изхранването на свине с оплесенен с *Ochraceus* фураж и наблюдаваните изменения при заклани животни, изразяващи се със специфични макроскопски промени от типа на т. нар. мраморирани бъбреци, а хистологично с тубуларна дистрофия и интерстициална фиброза.

Krogh, P., 1974a,b, а също и други автори изказват становището, че охратоксин предизвиква болестни състояния при животните характеризирани се с увреждане на бъбречната функция. По-късно след откриването на охратоксин А и експериментални изследвания става ясно, че този микотоксин е основния причинител на нефропатията при животните.

Особено чувствителни към действието му са свинете и птиците. В зависимост от количеството на приетия токсин, често тази микотоксикоза протича като заболяване с неизяснене клинична симптоматика, включваща само изоставане в растежа и развитието, намалена продуктивност, имуносупресия и намалена консумция на фураж.

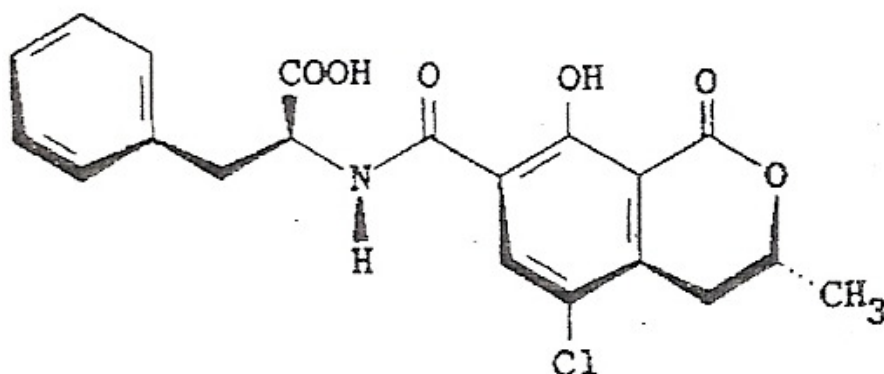
Табл. 8 Микроскопични гъбички, продуценти на охратоксини

Охратоксините А, В, С представляват група от структурно свързани плесенни метаболити с нефротоксично действие. Най- често като естествен замърсител на хранителни продукти и фуражи се доказва охратоксин А изолиран за 1-ви път от култура на *Asp. ochraceus* в Ю. Африка (Van der Merwe et al., 1965a,b; Steyn, 1966; Steyn and Holzapfel, 1966). В последствие се установява, че продуценти на охратоксини могат да бъдат и някои видове микроскопични гъбички от род *Penicillium*, най- често *P. veridicatum* (табл. 8).

Охратоксините представляват изокумаринови съединения, които чрез пептидна връзка са свързани с L- фенилаланин.

Penicillium (Chu, 1974)	Aspergillus (Hesseltine et al., 1972)
<i>P.purpurescens</i>	<i>A.sulphureus</i>
<i>P.commune</i>	<i>A.sclerotiorum</i>
<i>P.viridicatum</i>	<i>A.alliaceus</i>
<i>P.palitans</i>	<i>A.melleus</i>
<i>P.cyclopium</i>	<i>A.ochraceus</i>
<i>P.variable</i>	<i>A.ostianus</i>
	<i>A.petrakii</i>

Фиг. 7 Структурна формула на охратоксин А



Охратоксин А

Охратоксин А (фиг.7) е безцветно кристално вещество, слабо разтворимо във вода, разтворимо в ацетонитрил, бензол, ацетон, спирт, хлороформ, алкални разтвори. В химически чист вид е нестабилен и много чувствителен на действието на светлината и въздуха. В разтвор на етанол може да се съхранява неограничено дълго време. При кислородна или ензимна хидролиза (под действието на карбопепсидаза и α - химитрипсин) охратоксин А образува α -охратоксин и освобождава α - фенилаланин. Охратоксин В също е кристално вещество , аналог на охратоксин А, но съдържа в молекулата си хлор. Той е около 50 пъти по- слабо токсичен от охратоксин А. За разлика от Охратоксин А и В, охратоксин С не е доказан като естествен замърсител, а само при култивиране на продуциращи шамове на *A. Ochraceus* върху хранителни среди при експериментални условия. По токсичност е близък до охратоксин А .

В ултравиолетовия спектър на светлината охратоксин А има зелена флуоресценция, охратоксин В- синя, а охратоксин С- бледозелена.

Продуцирането на охратоксин А става изключително по време на съхранение на зърнените субстрати при влажност над 15%. Поразяването на растенията с микроскопичните гъбички, способни да образуват опратоксини става още на полето. Оптималната температура за развитието на *Asp. ochraceus* е 8 до 37⁰С, а за токсинообразуването 12-37⁰С. Някои щамове на *P. viridicatum*, температурния оптимум е от 0 до 31⁰С, а за синтезата на токсина 16-24⁰С.

Най-важен фактор повлияващ токсинообразуването е т.н. “хигроскопична влага на субстрата”. Относителната хигроскопична влага необходима за синтеза на охратоксин А от *A. ochraceus* е 0,99, а за *P. viridicatum* 0.95-0.99.

Богати на мазнини субстрати като фъстъци, соя и др. са благоприятна среда за охратоксинова продукция от *A. ochraceus*.

Допуска се, че микроскопичните гъбички *A. ochraceus* и *P. viridicatum* за различен период от време могат да продуцират максимално количество охратоксин, след което този процес намалява.

Първо съобщение за охратоксин А, като замърсител на царевича е направено от Shotwell, O., et al., 1969. Резултатите от последвалите изследвания показали, че от зърнените и зърноподобните култури царевичата, пшеницата, ечемика се явяват основни растителни субстрати, които се доказва охратоксин А.

Охратоксин А и В в значителни количества са доказани в ечемик, овес, царевича, пшеница произведени в Европа- скандинавските, а също и в балканските страни, САЩ, Япония. Честотата на замърсяване през отделните години варира от 1-56% от добитата реколта, а нивото на контаминиране от 5 до 68,9 ppm. В тази връзка можем да посочим, че най- висока замърсеност на царевича с охратоксин А в количество до 69 ppm е доказана в проби царевича добита в Югославия. Зърнените фуражи от Индия, Канада и Австралия често са контаминирани с охратоксин А, като стойностите достигат до 4-5 ppm. Токсинът се открива още в соята, боба, граха, зеленото кафе на зърна, какао на зърна, подправки, билки, гроздов сок и пр. (Борисова, Л., 2005).

При извършените микотоксикологични изследвания у нас от Борисова, Л. и кол.(2000) е установено, че около 42 % от пшеницата добита в Североизточна България е обсеменена с вида *P. viridicatum*, способен да продуцира охратоксин А при определени условия. Установеното количество на токсина при съхранение на пшеницата е в количество 76 до 121 ppb. Охратоксин А се продуцира изключително по- време на съхранението на зърнените фуражи.

Част от видовете на плесените от род *Aspergillus* и някои щамове на *P. viridicatum* могат да продуцират още един нефротоксичен микотоксин-цитринин. Доказването на токсина в пшеницата, произведена у нас, безспорно играе съществена роля в патологията на установените случаи на нефропатията при свинете и птиците. (Борисова и кол., 2000).

Охратоксините се характеризират с избирателното си действие към бъбречните проксимални тубули, като намаляват метаболитния клиъранс и способността за концентрация на урината, инхибирайки анионния транспорт и предизвиквайки освобождаване на бъбречни ензими.

Охратоксините притежават тератогенни свойства. Охратоксин А има и изразено имунотоксично действие. Предизвиква редуциране на стволловите клетки в костния мозък и далака, нарушава хемопоезата при птиците.

Предполага се, че като силен инхибитор на протеиновия синтез и окислителното фосфолириране в митохондриите може да забави пролиферацията на клетките от имунната система. Подтиска образуването на Т и В лимфоцити. Имунотоксичното действие на охратоксин А може да се дължи на способността му да редуцира стволите клетки в костния мозък и далака (Elaroussi et al., 2006).

2.4 КАК ДА СЕ ПРЕДПАЗИМ ОТ МИКОТОКСИНИТЕ?

Съществуват три основни подхода за предпазване и контрол от плесени и микотоксини – преди жътва, след жътва и по време на съхранението.

1) *Преджътвени /агротехнически/ мерки* – създаване и използване на сортове с комплексна устойчивост към първични заболявания; избягване на моносортието и отглеждане на сортове с различни биологични и стопански качества; използване на здрави и обеззаразени семена за посев, оптимално торене, спазване на нормите за гъстота на посевите, с оглед получаване на силни физиологично здрави растения; използване на химични методи за борба с фузариотоксикозата по класовете (пръскане с фунгицидни препарати при установяване на заболяване). Веднага трябва да посочим, че няма разработени универсални фунгицидни средства срещу плесенното обсеменяване, когато растението е още на полето. Прилагането на тези препарати, според най-нови данни, може да доведе до нарушаване на равновесието между токсични и нетоксични плесенни видове. С това се увеличава риска от преобладаването на паразитни фузарийни видове, които най-често се явяват продуценти на микотоксини (фузариотоксини).

2) *Следжътвени мерки* – прибиране на зърното в кратки срокове и подходящи климатични условия (без валежи), поддържане на ниска влага в зърното (под 0,7 % активна влага) преди съхранението, почистване на семената от плевелни и други примеси.

3) *Мерки по време на съхранението* – Поддържане на оптимални параметри – влажност на зърнената маса, температура и влажност на околната среда, степен на аериране на зърното. Методите за борба с допълнителното плесенно обсеменяване, а оттам и продуциране на микотоксини, могат да бъдат физични, химични и биологични (Борисова, Л., 2005).

2.1. *Физични методи* – използват се при ниска степен на плесенна обсемененост. Имат ограничено приложение в практиката. Към тези методи се отнасят топлинната обработка, почистване, сепариране, гранулиране, екструдирене, експандиране, UV-радиация и УВ лъчение;

- сушене на зърното на въздух, загрят до 50-60⁰С. Целта е да се намали съдържанието на влага в субстрата, като по този начин в значителна степен се убива повърхностната плесенна флора. Влагата в зърното активира микробиологичните процеси и се явява главна причина за продуцирането на микотоксини. Ако зърното се съхранява с влага под критичната, то микроскопичните гъбички не се развиват, респ. опасността от образуването на микотоксини намалява. Най-големи загуби има при съхраняване на зърното с влага над допустимата. Границите за влажност при съхранение на зърнени компоненти са доста стеснени, като максималните стойности за пшеницата са 13%, на царевичката 14%, за ечемик, овес, сорго 13 %. За слънчогледа, фъстъците и други суровини, богати на мазнини, влагата не трябва да превишава 8,5 %.

Обработването на субстратите с влага и топлина, в комбинация, е ефективен метод за намаляване на плесенната обсемененост. Този способ е залегнал в технологичните процеси – гранулиране, екструдирание, експандиране и др., имащи положителен ефект върху намаляването на плесенната флора.

- Сепарирането на зърното при прибиране и съхранение. Дребните по-леки, шуплести, механически травмирани, начупени и оплесенени зърна, обикновено съдържат микотоксини. Установено е, че в здравето зърно няма или има само следи от микотоксини, докато в начупените зърна, могат да се открият значителни количества. Начупените, сплескани и шуплести зърна съдържат от 30 до 150 пъти повече патогенна микрофлора, в сравнение със здравите зърна. Експериментално е доказано, че при отстраняване на дребните фракции зърно /пшеница, царевица, ечемик/ значително се намалява концентрацията на микотоксините.

- Облъчване на зърнената маса с гама-радиация и ултравиолетово облъчване. При дози от 1 до 3 kGy е установено задържане на растежа на плесенния мицел, а при 9 kGy се спира и токсинообразуването.

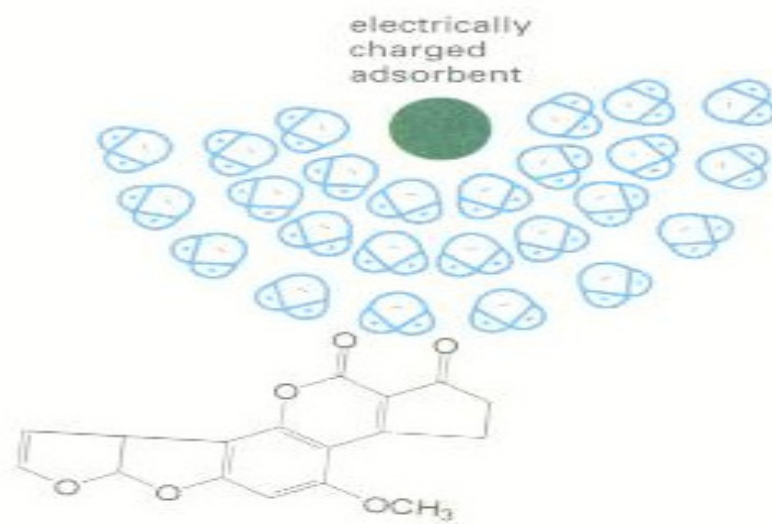
Ултравиолетовото облъчване също може да се използва като превантивна мярка срещу развитието на микроскопичните гъбички и продуцираните от тях метаболити. В това отношение са постигнати успехи при детоксикацията на афлатоксин В1. Независимо от това съществуват доста проблеми и неизяснени въпроси, тъй като първично разградените продукти също могат да бъдат токсични.

Разгледаните физични методи могат да се прилагат предимно само за предпазване на зърнените компоненти и комбинираните фуражи от обсеменяване с микроскопични гъбички, продуценти на микотоксини. Използването им обаче за детоксикация на образуваните микотоксини е ограничено и неефективно.

2.2 Химични методи - Използването на минерални глини, като адсорбенти на микотоксини;

Първите проучвания датират от 70-те години на миналия век, след публикуването на редица материали за адсорбиращия им ефект по отношение на афлатоксините. Най-често използвани бяха бентонинът, зеолитът и алуминосиликатите. Последните са най- високо ефективни по отношение на микотоксините, в това число и на афлатоксините (Phillips et al., 2002; Ortatatli and Oguz, 2001; Rosa et al., 2001; Ibrahim et al., 2000; Oguz and Kartoglu, 2000; Oguz et al., 2002).

Механизмът на действие на природните глини се базира на тяхната кристална структура. Молекулната повърхност на алуминосиликатите, насищайки се с вода в организма на животните, привлича полярните атомни структури на микотоксините и ги свързва с повърхността си (фиг.9). По този начин става изолиране на микотоксина и той не може да бъде адсорбиран от организма и се предотвратява попадането му в кръвния ток, още в процеса на храносмилането (Van Kessel and Hiang-Chek, 2001; Devries et al., 2002).



Фиг.9 Механизъм на действие на адсорбентите

Хидратиранят натриево- калциев алуминосиликат, добавен в доза 0,5% към дажбата на птици, понижава редица вредни ефекти на афлатоксините, а включването му в дажбата на млечни крави, понижава съдържанието на афлатоксин М1 в млякото на животните.

Наред с положителните резултати, много автори са публикували данни и за отрицателния ефект от използването на зеолити или глини като биндери, при фуражи съдържащи различни микотоксини.

Един от недостатъците на използваните глини и зеолити е сравнително високото им съдържание в комбинираните фуражи, както и техния определен спектър на действие. Друг недостатък е, че те са ефективни като детоксикатори главно за афлатоксините и имат незначителен или много слаб ефект към други широко разпространени микотоксини, каквито например са фузариотоксините (зеараленон, дезоксинивленол, Т-2 токсин, фумонизини).

- Използването на неорганични киселини и техните соли, които потискат развитието на плесени, най-вече в зърнените суровини или готовите комбинирани фуражи. Най-често използваните киселини са фосфорна, пропионова, млечна, лимонена, фумарова, мравчена, или комбинации от тях, както и някои техни соли. Действието на неорганичните и органичните киселини се изразява преди всичко с антибактериалния, пробиотичен антистресов и хелатен ефект. Пропионовата киселина е най-ефективна от всички органични киселини като инхибитор на микроскопичните гъбички и техните спори. Подобен ефект има и нейната сол – калциев пропионат.

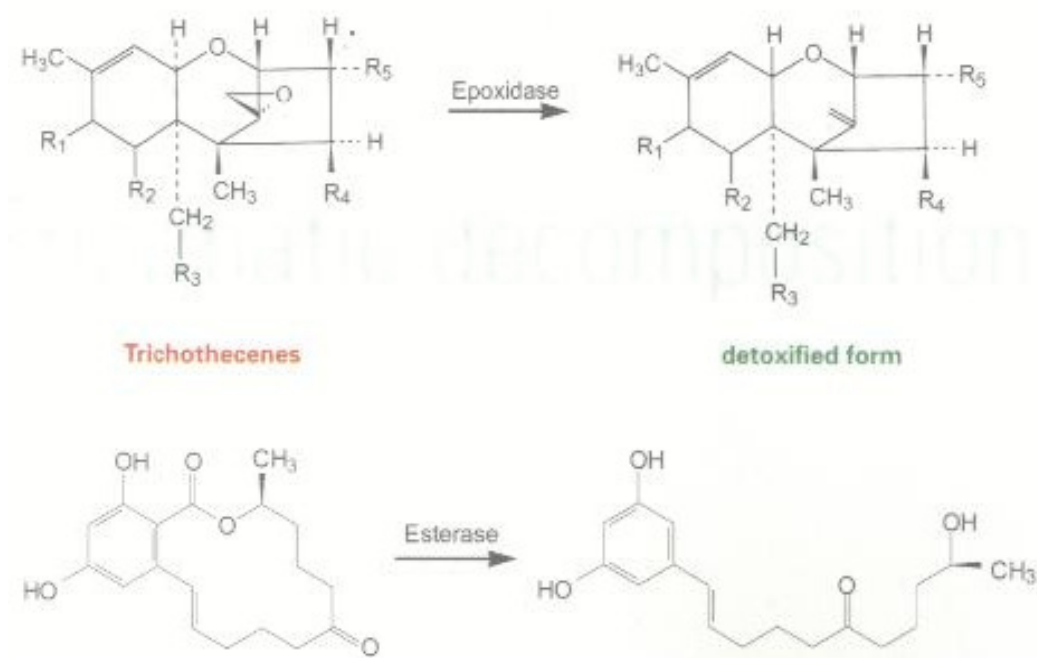
Във връзка с детоксикацията на микотоксините, внимание заслужава синтетичната аминокиселина d,l-метионин. След процеса на храносмилане микотоксините попадат в кръвния ток и кумулират в черния дроб, където част от тях се детоксицират. Процесът на детоксикация е окислително-редукционен и е свързан с участието на глутатион. Глутатионът съдържа в молекулата си метионин и цистин, поради което изчерпва наличността на метионин. Това води до влошаване усвояемостта на фуража, а от там, се намалява растежа и продуктивността. За недопускане на негативните ефекти, във фуражи, съдържащи микотоксини е необходимо поддържане на високо ниво от метионин. Проучен е и ефекта на триптофана по отношение съдържанието на ДОН, но не е получен положителен резултат.

Изпитано е и действието на меден сулфат, водороден прекис, натриев бикарбонат, витамин С и др., но ясно изразено становище по отношение положителният им резултат няма.

-Третиране на съхраненото зърно с противоинсектицидни препарати под формата на фумиганти.

2.3. *Биологични методи* - нова генерация субстрати за деактивация на микотоксините са разработени на базата на различни ензими, живи дрождеви култури, микроорганизми на стомашно-чревния тракт, глюкоманани и др.

а) Ензимните продукти естераза и епоксидаза притежават способността да разрушават функционални групи в молекулата на микотоксините и да ги превръщат в нетоксични съединения. Механизмът на действие на ензима епоксидаза се свежда до разграждането на 12,13-епоксидната група на трихотецените, което води до нетоксична форма, а това на ензима естераза – до хидролиза на естерите на зеараленона до напълно безвредни метаболити (фиг.10).



Фиг.10 Ензимно разграждане на микотоксините до нетоксични съединения

Има данни за биотрансформацията на микотоксините от микрофлората на храносмилателния тракт. Търбушната микрофлора притежава доказана способност да разгражда охратоксините до нетоксични метаболити. Установено е, че говежди търбушни микроорганизми и фекална микрофлора на прасета, кучета и кокошки водят до биотрансформация на Т-2 токсин, ДАС и ДОН в разновидности на диацетил-детоксидазни продукти и техните епоксидни продукти, които са значително по-малко токсични.

б) При изследвания в Индия,САЩ, Канада е доказано, че модифицираните мананоолигозахариди, имащи в основата си естерифициран глюкоманан, извлечен от клетъчната стена на *Saccharomyces cerevisial* щам 1026, притежават способността да се свързват с образуваните микотоксини и да ги обезвредят. Доказано е, че мананоолигозахаридите свързват афлтоксините

до 95 %, зеараленона до 77 %, фумонизина до 59 % и ДОН до 12 %, и че те са по-ефективни в сравнение с продуктите на база глинни (бентонит, алуминосиликати) – (фиг.11).



Фиг.11 Триизмерна структура на глюкан от дрождева стена (Connolly and O'Sullivan, 2005)

Наред с високата си микотоксин-свързваща активност, модифицираните мананоолигозахариди притежават и подчертани имуностимулиращи свойства. От проучванията на Devegowda et al. (1998) е установено, че мананоолигозахаридите, добити от клетъчната стена на дрожди, са с висока степен на антигенност, в сравнение с други мананови и глюканови компоненти. Според авторите антигенността им варира в зависимост от вида на дрождите и от степента на фосфорилиране на манановата структура. При опити с пуйки авторите установяват, че мананоолигозахаридите влияят имуностимулиращо на организма, като увеличават с 30 % концентрацията на IgA и с 26 % IgG в кръвната плазма.

в) Засилване функцията на черния дроб – На база специфичен дрождев екстракт са разработени препарати, които участват в синтеза на протеини и възстановяват черния дроб чрез замяна на увредените (нефункциониращи) клетки и чрез засилване деконтаминиращия му муханизъм. За обновяване на една чернодробна клетка са необходими повече от 3×10^9 нуклеотиди, за удвояване на ДНК, отговорна за синтеза на протеини.

Обобщавайки представените методи, трябва да подчертаем, че не съществува “магическа” формула за обезвреждане на токсичните плесенни метаболити.

Изложените до тук данни за разностранното биологично и токсикологично действието на микотоксините поставя въпроса, за постоянния контрол по отношение наличието на тези контаминанти. Без успешното решаване на проблема за наличието на микотоксините във фуражите, животновъдството ще продължава да понася съществени икономически загуби, без да се пренебрегват и сериозните екологични и социално здравни проблеми.

Изключително важен момент е, че от 2005 г. проследяването на безопасността на храните от “източника до крайния потребител” стана законово задължение в Европейския хранителен сектор. За да се отговори на тези нови изисквания и закони, производителите на храни и фуражи, ще трябва да съсредоточат усилията си върху използването на всички съвременни стратегии за ограничаване на микотоксините като замърсители, както на фуражите, така и на хранителните продукти, за да се елиминира риска от тях. Това може да стане само при познаване на микологичния статус на основните зърнени фуражи, произведени у нас, чрез установяване степента на обсеменяване с токсични плесенни видове, продуценти на микотоксини и микотоксикологичния, определящ се от продуцираните от тях микотоксини, с оглед профилактиката на микотоксикозите.

В тази връзка съгласно Препоръка на Комисията 2006/576/ЕС от 17 август 2006 г в Република България, като член на ЕС, се прилагат препоръчителните стойности за наличието на деоксиниваленон, зеараленон, охратоксин А, Т-2, НТ-2 токсин и фумонизини в продукти, предназначени за хранене на продуктивните животни.

В Наредба № 10/април 2009 г за максимално допустими концентрации на нежелани субстанции и продукти във фуражите (ДВ, бр.21/10 март 2006 г., изм.ДВ, бр.82/12 октомври 2007 г.) са посочени максимално допустимите концентрации на афлатоксин В1:– в комбинирани фуражи за говеда, овце и кози – 0,05 ppm

- млекодайни животни – 0,005 ppm
- телета и агнета – 0,01 ppm
- комбинирани фуражи за свине и птици – 0,02 ppm.

III. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Вниманието към микроскопичните гъбички, поразяващи зърнените фуражи и продуцираните от тях микотоксини, се налага от факта, че дори ниските им нива могат да доведат до здравословни проблеми при продуктивните животни и консуматорите на животински хранителни продукти и големи икономически загуби.

РБългария е в климатичен район, изключително подходящ за развитието както на микроскопичните гъбички от род *Fusarium*, характерно за умерените климатични райони на планетата, така и на тези от род *Aspergillus* и *Penicilium*. Това налага въвеждането на мониторинг относно контаминирането на зърнените фуражи, произвеждани у нас с токсични плесенни метаболити и възможността им за предизвикване на патология при продуктивните животни.

Целта на настоящите проучвания беше да се даде характеристика на микологичния и микотоксикологичен статус на основните зърнени суровини произвеждани у нас, с огледа реална опасност за продуктивността и здравния статус при свине и птици. За решаването на тази цел формулирахме следните конкретни задачи:

1. Проучване на микологичния статус и степента на обсеменяване с токсични плесенни видове, продуценти на микотоксини на пшеница и царевица по време на прибиране от полето и съхранение;
2. Проучвания на микотоксикологичен статус на пшеницата и царевицата по време на прибиране и съхранение;

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

2.1. МИКОЛОГИЧНИ И МИКОТОКСИКОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

В периода 1995 - 2008 г бяха изследвани общо 897 представителни проби пшеница и царевица на зърно, произхождащи от три големи зърнопроизводителни райони на страната – Североизточна България (СИБ) - Добрич, Силистра, Разград, Русе, Варна, Северна България (СБ) - Плевен, Монтана, Велико Търново и Южна България (ЮБ) - Сливен, Ямбол, Пловдив,

характеризиращи се с особености в климатичните условия по време на растеж, вегетация, зреене и прибиране на зърното. Пробите се вземаха по схема – непосредствено след прибиране от полето (срок от около един месец от жътвата до съхранението) и по време на съхранението – 3,4, или 5 месеца, период в които може да настъпят качествени и количествени промени, както в микологичната находка, така и в микотоксикологичния статус на зърното.

Пробите се вземаха от открити площадки, плоски складови помещения, силосни кули и метални клетки – различни технологични решения за съхранение на зърно. Проби се вземаха от складови помещения, в които се спазваха технологичните параметри за правилно съхранение (активно вентилиране) и от такива, в които не се спазваха изискванията (естествена вентилация).

На всички проби бяха извършени:

2.1.1. Микологични изследвания за установяване на:

2.1.1.1. Обща плесенна обсемененост

По 100 царевични или пшеничени зърна от всяка проба се посяват в петриеви панички върху среда на Чапек – Докс. Посявките се култивират в термостат при температура 25°C. На 72-ия час се отчита обсеменяване с плесени от род *Aspergillus*, *Penicilium*, *Rhizopus*, а между 5-7-ия ден на тези от род *Alternaria*, *Trichoderma*, *Fusarium*. Отчита се броя на зърната поразени от изброените плесенни видове на съответния род и се изчислява процента на поразеност – БДС 11374/86.

2.1.1.2. Степен на поразеност чрез разкриване на дълбока микофлора

За отстраняване на повърхностната микофлора и разкриване на дълбоката, царевичните зърна се подлагат на дезинфекция със 70 % етилов алкохол в продължение на 5 минути и след трикратно промиване със стерилна вода се нанасят върху повърхността на хранителната среда. Култивират се при 25 °C от 5 до 10 дни по метода на Станкушев и Спесивцева (1971). Чисти култури за идентифицирането на видове от род *Fusarium* и *Aspergillus* култивирани на селективна среда бяха определяни по Nirenberg /1976 / чрез микроскопиране и **Moreno** (1988).

2.1.2. Микотоксикологични изследвания на фуражи и готови гъбични култури за съдържание на афлатоксин В₁, зеараленон, дезоксиниваленол, Т-2 токсин, охратоксин А чрез:

- тънкослойна хроматография;
- моноклонална имуноафинитетна хроматография, флуориметър на Romer labs.
- ELISA с китове на Romer labs.

3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. МИКОЛОГИЧНИ И МИКОТОКСИКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ

3.1.1. Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на пшеница, реколта 1995-1999 г

Географското положение и климатичните условия у нас определят до голяма степен развитието на гъбичната флора по основните зърнени суровини – царевица и пшеница и продуцираните от тях микотоксини.

При нашите изследвания съсредоточихме вниманието си предимно към гъбичните видове от род *Fusarium*, а в последствие и към тези от род *Aspergillus* – имащи най-широко разпространение у нас.

Извършените проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на произведените у нас основни зърнени суровини – пшеница и царевица, показаха, че почти винаги са били обсеменени с токсични плесенни видове, способни да продуцират богата гама микотоксини.

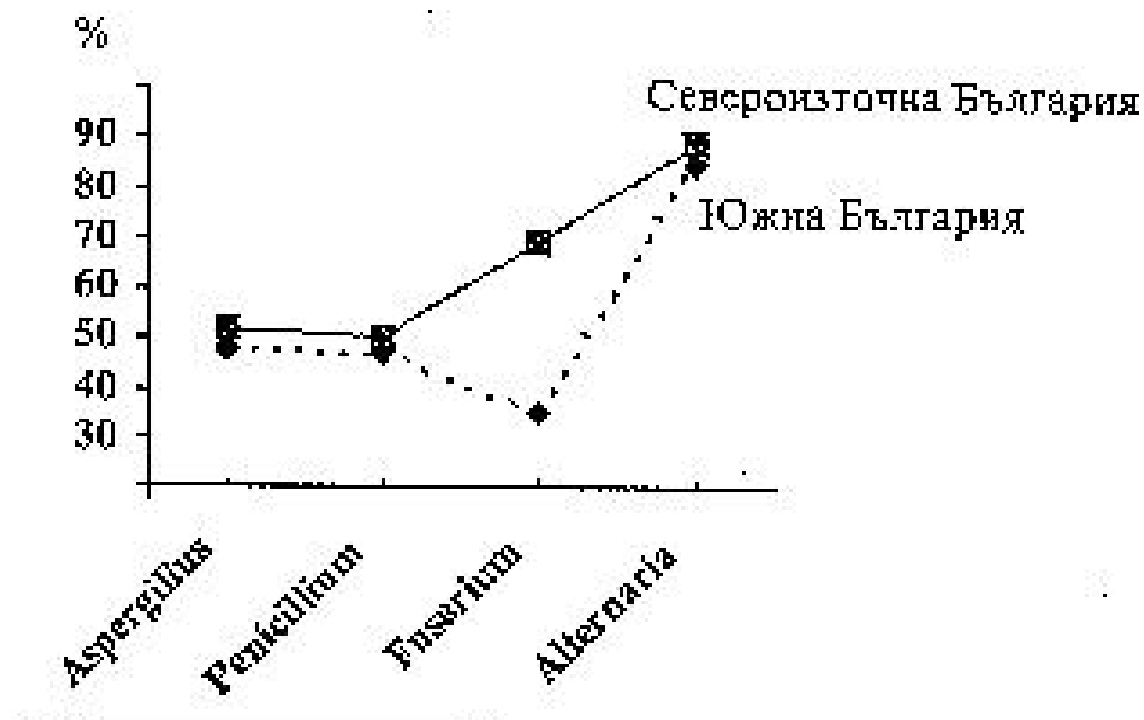
Резултатите от проведените проучвания през последните години доказаха, че освен на фузариотоксините, сериозно внимание трябва да се обърне и на другите микотоксини, като например афлатоксините, за които до сега считахме, че са приоритетни за тропичните зони на планетата, и у нас не съществуват подходящи условия за продуцирането им. Не за подценяване са и охратоксините, микотоксини, които могат да бъдат продуцирани както от плесени от род *Aspergillus*, така и от видове от род *Penicillium*. Проведените проучвания показаха, че микологичната характеристика на зърнените суровини не е постоянна величина, а непрекъснато се променя под влиянието на множество фактори, най-важни от които вероятно са климато-географските особености на територията на РБългария. Тя от своя страна определя и микотоксикологичния статус на изхранваните фуражи, а оттам и опасността от неблагоприятния при продуктивните животни.

За периода 1995-1999 г. бяха изследвани общо 362 преставителни проби пшеница на зърно, от които 84 взети непосредствено след прибирането от полето и 278 след 3-месечно съхранение. При извършените микологични изследвания на пробите пшеница на зърно, непосредствено след прибирането и от полето, в процеса на зареждане на различните по технологични решения складови помещения (плоски складови помещения, силосни кули и метални клетки) за съхранение беше установено, че няма съществена разлика във видовия състав на плесенната флора от двата основни зърнопроизводителни района – СИБ и ЮБ.

Микроскопичните гъбички бяха представени главно от род *Fusarium* (с преобладаващи видове *F.graminearum*, *F.moniliforme*, *F. tricinctum*), от род *Aspergillus* (с видовете *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.clavatus*), от род *Penicillium* (с вида *P.viridicatum*), род *Alternaria* (с *Al.tenuis*), *Cladosporium* sp., *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*. Поразеността на пшеницата с плесени от род *Aspergillus* бе почти еднаква за двата района и се движеше между 48 и 52 %, в т.ч. *A.flavus* 65 %, *A.fumigatus* 52 %, *A.niger* 14 %. Това се отнасяше и за плесените от род *Penicillium* – около 48 % (в т.ч. *P.viridicatum*), *Alternaria tenuis* – до 87 %, *Cladosporium* sp. – до 27 %, *Mucor* и *Rhizopus* – до 58 %.

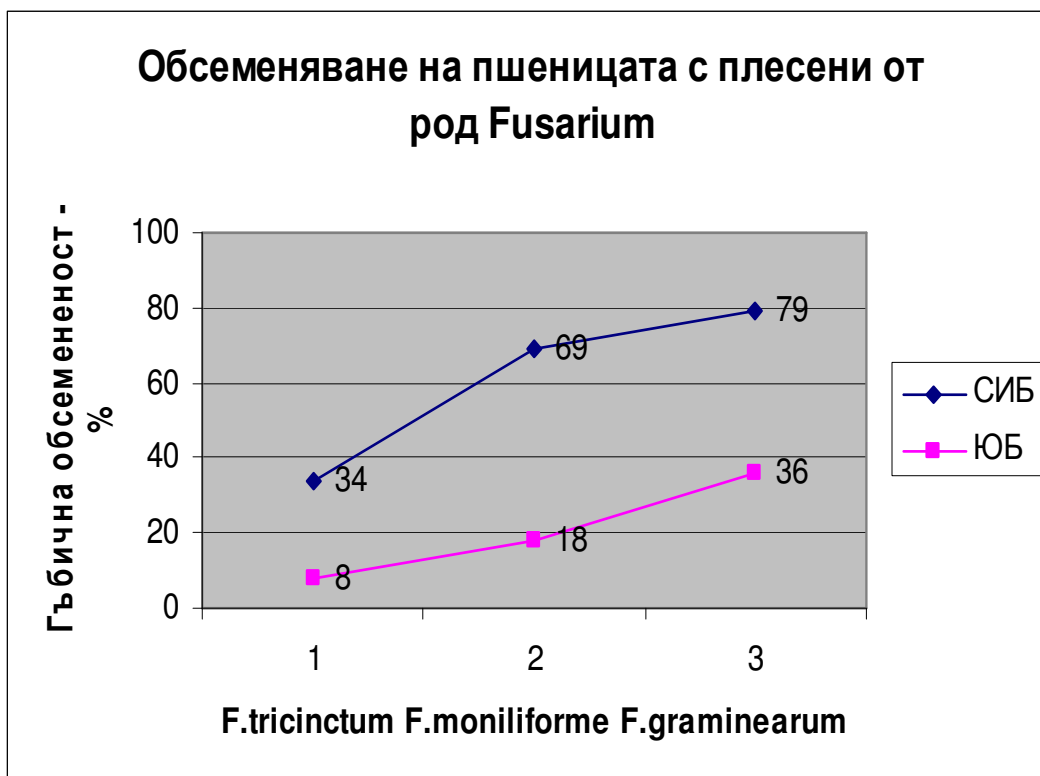
Чувствителни бяха различията в контаминирането на пшеницата, произведена в районите на СИБ с плесени от род *Fusarium*, принадлежащи към екологичната група на „полевите плесени“, склонни към паразитно съществуване, където обсеменяването достигаше до 87%, в сравнение с

добитата в ЮБ, при която стойностите достигаха до 36% (фиг.12).



Фиг.12 Микологичен статус на пшениченото зърно, непосредствено след прибирането от полето.

От данните представени на фиг.13 става ясно, че характерна особеност на пшеницата, произведена в районите на СИБ са по-високите нива на обсеменяване с видовете *F. Graminearum*–до 79 %, с *F.moniliforme* до 69%, с *F.tricinctum* – до 34 % , основни продуценти на фузариотоксините-деоксиниваленол и зеараленон - фиг.13.



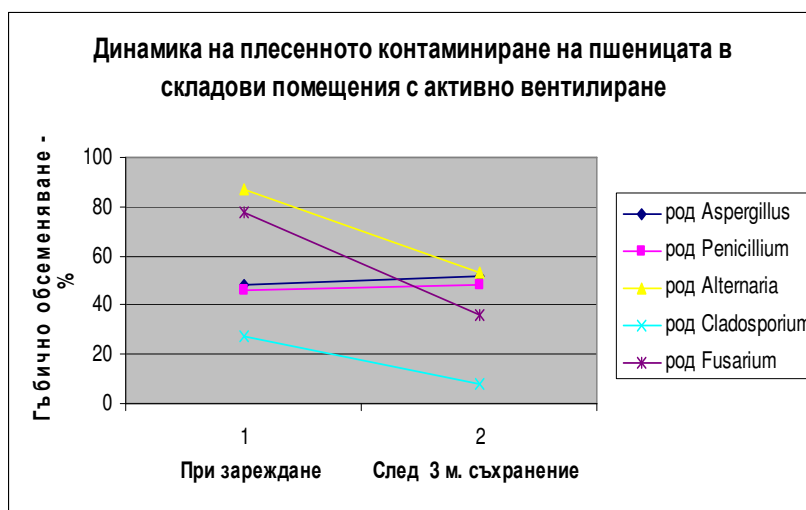
Фиг.13 Обсеменяване на пшеницата с плесени от род *Fusarium*

Присъствието на видове като *Alternaria tenuis*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, се разглежда като нормално контаминиране в току-що прибраното зърно, тъй като те също се отнасят към групата на т.н. „полеви плесени”, изискващи за развитието си по-високо съдържание на влага.

При интерпретиране на резултатите за плесенната обсемененост на пшеницата след прибирането и от полето, правеше впечатление значителната обсемененост с вида *Penicillium viridicatum* – около 42-48%, отнасящ се към микроскопичните гъбички, потенциални продуценти на охратоксините, токсични плесенни метаболити, опасни за здравето на човека и животните.

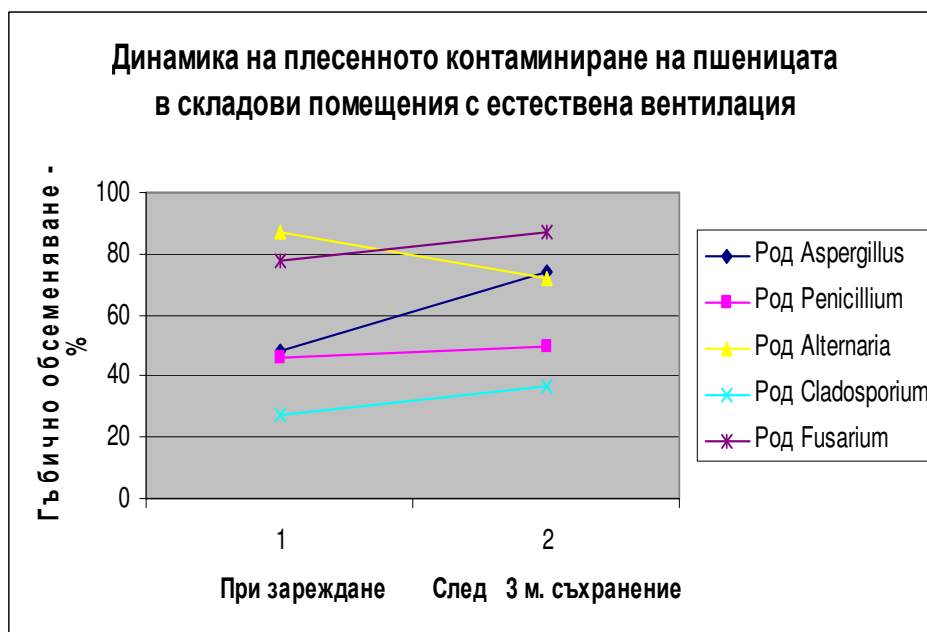
Резултатите от микотоксикологичните изследвания, извършени на всички проби пшеница (1995-2000) от двата зърнопроизводителни района – СИБ и ЮБ, непосредствено след прибирането им от полето, независимо от високата степен на обсемененост с токсични плесенни видове от род *Фузариум* не показаха наличие на фузариотоксините – зеараленон (F-2 токсин), дезоксиниваленол (ДОН) и T-2 токсин, а също така на афлатоксини, и на охратоксини.

Резултатите от микологичните изследвания на пробите пшеница след 3-месечно съхранение в различните типове складови помещения с оптимален температурно-влажностен режим (с активно вентилиране), показаха характерна динамика в количествения и качествения състав на плесенната флора (фиг.14).



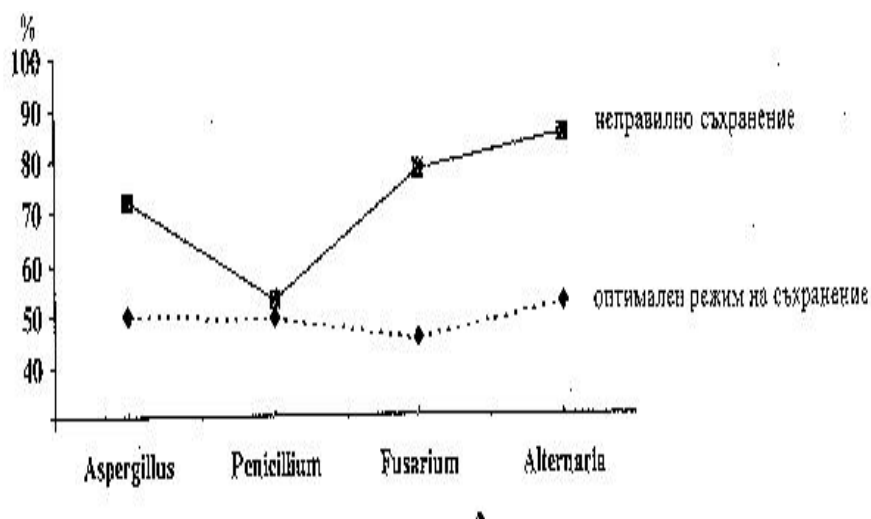
Фиг.14 Динамика на плесенното контаминиране на пшеницата в складови помещения с активно вентилиране

Пробите пшеница бяха обсеменени със спори на гъбичките от род *Aspergillus* до 48% (от тях 62% от *A.flavus*, 28% от *A.fumigatus*, 24% от *A.niger*), от род *Penicillium* – 46%, *Alternaria tenuis* - 53%. В 48% от пробите се откриваха спори на плесените от род *Fusarium* (от тях 68% на *F.graminearum* и 39 % на *F.moniliforme*). Резултатите показват значително намаляване на процента на т.нар. «полеви плесени», към които спадат тези от род *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* за сметка на т.нар. «складови плесени» – предимно от род *Aspergillus* (с най-чести представители *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*) и род *Penicillium*, но те не надхвърляха първоначално установените стойности (фиг.15)



Фиг.15 Динамика на плесенното контаминиране на пшеницата в складови помещения с естествена вентилация

Чувствителни разлики в състава на плесенната находка бяха установени предимно в пробите пшеница от Североизточна България, взети от складови помещения, с естествено вентилиране, в които не бяха спазени технологичните изисквания за правилно съхранение на зърното (поставено зърно с по-висока от стандартната влажност, липса на активно вентилиране, аерация, лабилен температурно-влажностен режим, образуване на кондензна влага и др.). Колебанията в температурно-влажностния режим на съхранение води до възникване на температурни градиенти и образуване на кондензна вода в междузърновото пространство, което се създават условия за бурно плесенно развитие. Резултатите от културелните изследвания на проби от такива партии показваха значителна фузариозна обсемененост - до 87 %, в т.ч. на видовете *F.graminearum* до 79 % и *F.moniliforme* – до 69 %.. Установява се също висока степен на обсемененост с т.н. ”складови плесени”. До 74%, от пробите бяха поразени с плесенни видове от род *Aspergillus* (от които с *Asp.flavus* – 65 %, *A.fumigatus* – 58 %, *A.niger* – 42%), с видове от род *Penicillium* до 46%, в т.ч. *P.viridicatum* – до 42 % (фиг.16).



Фиг. 16 Микологичен статус на пшеница – зърно от СИБ след 3-месечно съхранение

Резултатите от извършените микотоксикологични изследвания на пробите пшеница, взети от складови помещения, с отклонения в технологичните изисквания за правилно съхранение едновременно с допълнителното плесенно контаминиране се доказва и продуциране на микотоксини. При 58 % от изследваните проби пшеница, се доказва наличие на фузариотоксина дезоксиниваленол (ДОН) в количество от 0,095 до 270 ppb. В 64 % от пробите беше доказано наличие на зеараленон в количество от 50 до 1350 ppb. Минимални количества на Т-2 токсин бяха установени в единични проби със силно дефектирани зърна.

Съществен момент при тези микотоксикологични изследвания беше доказаното съдържание на охратоксин А в количество от 76 до 121 ppb, изключително в проби от Североизточна България. Вероятен продуцент на този плесенен метаболит, играещ съществена роля в патологията на свинете и птиците, при нашите условия е видът *P.viridicatum*, способен да продуцира охратоксини при съхранение на зърното. При микологичните изследвания не

беше доказана микроскопичната гъбичка *Asp. ochraceus*, считана за основен продуцент на охратоксините.

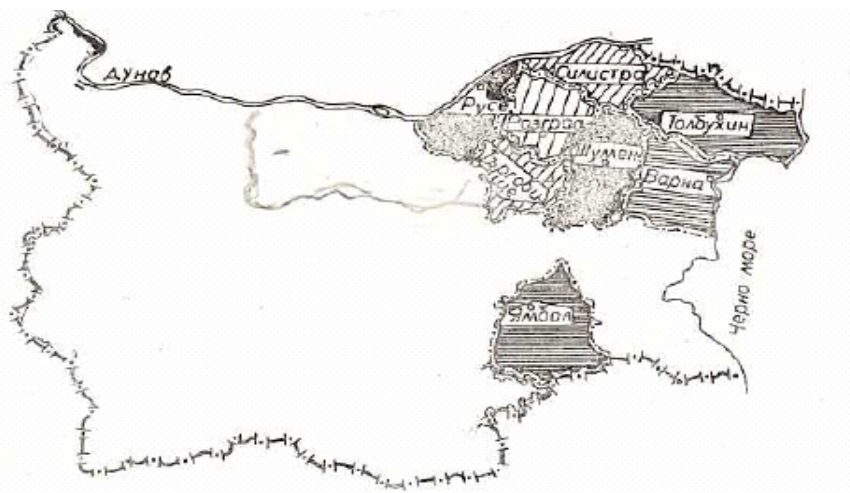
Резултатите от проведените микологични и микотоксикологични изследвания в периода 1995-1999 г. показаха, че плесените от род *Fusarium* са основен контаминант на пшеницата, произведена у нас. Зърното, произведено в районите на СИБ е в значително по-висока степен обсеменено с токсичните плесенни видове - *F.graminearum* и *F.moniliforme* в сравнение с това от ЮБ. Вероятно, една от най-съществените причини за високата фузариозна поразеност в тази част от територията на страната ни се дължи основно на климатогеографските особености – резки денонощни температурни колебания, вид почва, релеф, брой слънчеви дни в денонощието и като отключващ фактор се явяват валежите по време на растеж и вегетация на пшеничното растение.

Този район от територията на РБългария с характерните си дадености в климатичните условия се явява рисков по отношение микологичния и микотоксикологичен статус на произведената пшеница.

Съхраненото зърно, с висока степен на плесенна обсемененост, с плесени от род *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, представлява лабилна система, реагираща на минималните отклонения от оптималните параметри на температурата и влажността при съхранението, с промени в количествения и качествен състав на плесенната флора и с натрупване на токсични плесенни метаболити – микотоксини.

3.1.2. Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на пшеница, реколта 2005 г.

Крайно неблагоприятните климатични условия (високо количеството на валежите) през 2005 г. в редица райони на страната – фиг.17 (Добрич, Разград, Русе, Плевен, Варна, Силистра, Ямбол) по време на растеж, вегетация и прибиране на пшеницата, благоприятстваха развитието на заболяването фузариоза.



Фиг.17 Региони с повишено количество на валежи през 2005 г. в България

Това наложи извършването на проучвания върху микологични и микотоксикологични статус на пшеницата, непосредствено след приключване

на вегетацията по време на прибиране на зърното от полето, в процеса на съхранението му.

От микологични изследвания на 62 представителни проби пшеница на зърно беше установено, че 37% от пробите са обсеменени със спори на плесени от род *Alternaria*, 14% от спори на *Aspergillus* (от тях *Asp.flavus* 28%, *Asp.fumigatus* 18%, *Asp.terreus* 8%, *Asp.clavatus* 8%), 12% от спори на *Penicillium*, 24% от спори на *Cladosporium* 34% от спори на *Mucor* и *Rhizopus*. От 90 до 100% анализирани проби пшеница бяха обсеменени със спори на микроскопичните гъбички от род *Fusarium*, представени главно от видовете *F.graminearum* и *F.moniliforme*. (фиг. 20). В почти 100 % от пробите беше доказан вида *F.graminearum*, а в около 35 % от пробите - *F.moniliforme*. Само в единични проби бяха доказани и други фузариумни видове (*F.tricinctum*, *F.solani* и др.). Резултатите от микологичните изследвания са показателни за висока степен на фузариозна поразеност. Процентът на зърната в пробите пшеница, поразени с микроскопичните гъбички *F.graminearum* и *F.moniliforme* за отделните райони на страната варираше, но се запазваше висок. Анализът на резултатите потвърждава становището, че микроскопичните гъбички от род *Fusarium* при благоприятни условия (валежи по време на вегетацията), поразяват масово зърнените фуражи още на полето, в процеса на тяхното развитие и зреене.

При анализирани резултатите от микологичните изследвания може да се обобщи, че видове като *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, т.н. „полеви плесени”, считани за нормални контаминанти на току-що прибраното зърно са в много ниски стойности, за сметка на високата степен на обсемененост с паразитните фузариумни видове.

При пшеница, реколта 2005 г беше наблюдавана и друга особеност на фузариозната поразеност – т.н. „скрита фузариоза” (фиг.19). Пшеничните зърна, от които масово се изолираше *F.graminearum* бяха с нормални органолептични показатели – големина, цвят, структура на паренхима и зародиша. По повърхността им не се наблюдаваха видими плесенни обложения и оцветяване, за разлика от „явната фузариоза”, при която поразените зърна са недоразвити, по-дребни, с увреден зародиш и паренхим, с видимо леко розово-червеникаво оцветяване – фиг.18.

Изключително важни за микотоксикологичния статус на пшеница, реколта 2005 г бяха резултатите от изследванията за установяване наличие на микотоксини. В пробите пшеница беше доказано, че по време на растеж и вегетация на зърното са продуцирани фузариотоксините – дезоксиниваленон и зеараленон. Количеството на ДОН варираше в широки граници от 0,250 ppm до 3-3,5 ppm. Със зеараленон бяха контаминирани повече от 50 % от пробите, а количеството му варираше от 0,150-0,200 ppm до 1,5 ppm. В значителен процент, около 24 % от пробите се доказваше едновременно присъствие на двата токсина. Тези резултати показват, че за степента на риска при наличие на микотоксини, следва да се съди не само по броя проби съдържащи микотоксина, но и от средните концентрации в тях.

При **микотоксикологичните** изследвания не бяха доказани афлатоксини и охратоксини.

Тези данни не съвпадат с резултатите от извършените микотоксикологични изследвания на пшеница на зърно, непосредствено след прибирането и от полето в периода 1995-1999 г, при които не беше доказано продуциране на фузариотоксини в т.ч. дезоксиниваленон (DON) и зеараленон (Борсова., Л., 2000).

Установените количества на деоксиниваленол и зеараленон в този ранен етап на проучване, непосредствено след прибиране на зърното от полето, са значително високи и са тревожен сигнал, че при по-продължително съхранение (до нова реколта) може да се стигне до допълнително плесенно обсеменяване и продуциране на микотоксини в значителни количества.

Резултатите от извършените микологични и микотоксикологични изследвания на пробите пшеница, реколта 2005 г. показаха, че не може да се установи определена зависимост между степента на обсеменяване с токсичните видове фузариуми и продуцираните количества на фузариотоксини.

Резултатите от микотоксикологичните изследвания ни дават възможност да изкажем становището, че фузариотоксини могат да се продуцират по време на зреене и вегетация на пшениченото зърно при определени условия. До сега ние считаме, че фузариотоксини могат да се продуцират изключително по време на съхранение на зърното.

Получените данни по отношение контаминирането на пшеница, реколта 2005 г с токсични плесенни метаболити от род *Fusarium* и наличието на фузариотоксините деоксиниваленол и зеараленон се отнасят изключително за райони в СИБ и СБ (Добрич, Разград, Русе, Плевен, Варна, Силистра, Ямбол). Това потвърждава нашето становище за ролята на климатогеографските особености в тези част от територията на РБългария за микологичния и микотоксикологичен статус на добитата пшеница. Това налага необходимостта от постоянен, ежегоден контрол върху микотоксикологичния статус на добитото зърно, с оглед профилактиката на микотоксикозите при продуктивните животни.



Фиг.18 Явна фузариоза



Фиг.19 Скрита фузариоза



Фиг.20 Масов растеж на *F.graminearum*

3.1.3 Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на царевица на зърно в периода 2000-2004 г

Проучванията бяха проведени върху 235 представтелни проби царевица на зърно, в т.ч 164 проби непосредствено след приключване на вегетацията, в

процеса на прибиране на зърното от полето и 68 проби след 4-5 месечно съхранение (при различни технологични решения на съхранение).

При извършените микологични изследвания на царевичата в периода 2000-2004 г. взета непосредствено след прибиране от полето, бе установено, че няма съществена разлика във видовия състав на плесенната флора през отделните години на проучванията. Микроскопичните гъбички бяха представени главно от видове на род *Fusarium* (с преобладаващи видове *F.moniliforme*, *F.graminearum* и само в единични проби *F.tricinctum*, *F.gibosum*), от род *Aspergillus* (с видовете *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*), от род *Penicillium* (с вида *P.species*) и по-малко от родовете *Alternaria*, *Trichoderma*, *Cladosporim*, *Mucor*, *Rhizopus*, традиционни за нашите климатични условия.

Процентът на пробите царевича, поразени с микроскопични гъбички от род *Fusarium* варираше в периода на проучването, но се запазваше относително висок. При установяване на микологичния статус на пробите царевича средно за периода, получените резултатите показваха контаминиране със спори на плесени от род *Aspergillus* – 52% (в т.ч. *A.flavus* – 42%, *A.fumigatus* – 45%, *A.niger*-42%), от род *Penicillium* -12%, *Alternaria tenuis* - 72%, *Trichoderma lignorum* – 22%, *Cladosporim* 45%, *Mucor* и *Rhisopus* – 35%, от род *Fusarium* варираше от 65 до 68 %. При културелните изследвания на царевичата беше установено, че почти 100 % в пробите, поразени от *Fusarium*, преобладава видът *F. moniliforme*.

При микологичните изследвания, извършени след 4-5 месечно съхранение, с повтораемост на регионите, от които бяха взети първоначалните проби, през отделните реколтни години, беше потвърдено, че гъбичната флора претърпява динамика в процеса на съхраняване. В пробите, взети от партиди, съхранени при оптимални параметри (с активно вентилиране, със стабилен температурно-влажностен режим, неповтарящ колебанията в температурата и влажността на атмосферния въздух, фумигиране с противоакарицидни средства за предпазване от складови вредители), процентът на т.нар. «полеви плесени» - от род *Alternaria*, *Cladosporim* към които спадат и токсинообразуващите видове от род *Fusarium* намалява.

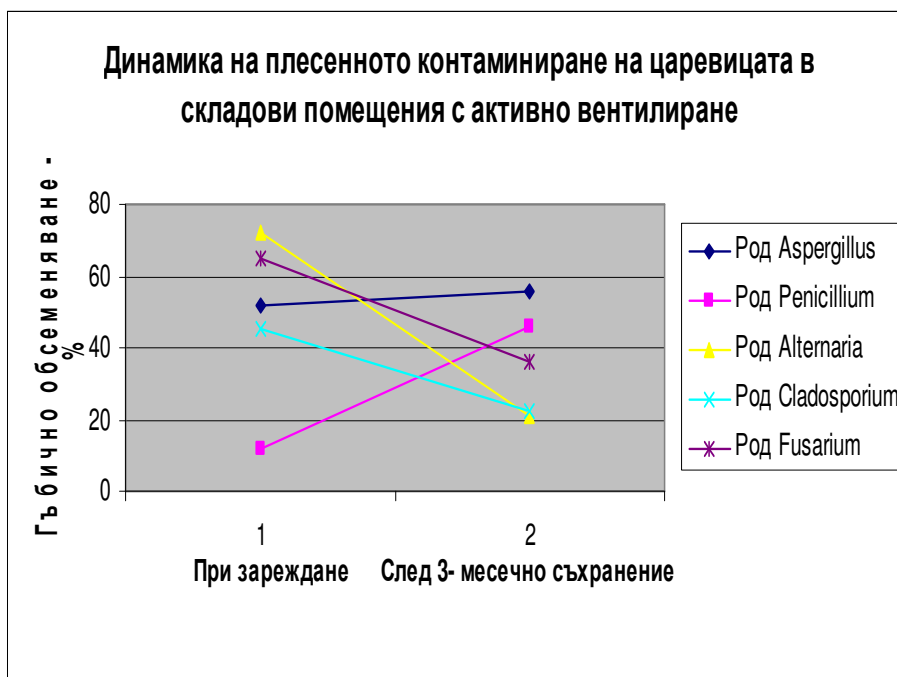
Пробите бяха контаминирани с плесени от род *Aspergillus* – 56% (в т.ч. *A.flavus* – 32%, *A.fumigatus* – 45%, *A.niger*-32%), от род *Penicillium* – 18%, от род *Alternaria* – 21% *Trichoderma lignorum* – 22%, *Cladosporim* 22%, *Mucor* и *Rhisopus* – 35%, от род *Fusarium* варираше от 43 до 46 %. При тези проби преобладаваха видовете от т.нар. “складови плесени” – от род *Aspergillus* (*A.flavus*, *A.fumigatus*, *A. niger*) и *Penicillium*, без да надвишават установените допустимите толеранси на плесенно обсеменяване. Намаляването на процента на т.н.”полеви плесени” по време на съхранението се възприема като критерии за правилно съхранение, тъй като за развитието им е необходима по-висока влажност – фиг.21. При оптимални условия на съхранение имат относително кратък живот и загиват.

Резултатите от извършените микологични изследвания на пробите царевича, взети от партиди, неправилно съхранени /фиг.22/ – с естествена вентилация, липса на аерация на зърнената маса, образуване на кондензна вода в междузърновото пространство, показваха също значителни промени в качествения и количествен състав на плесенната находка.

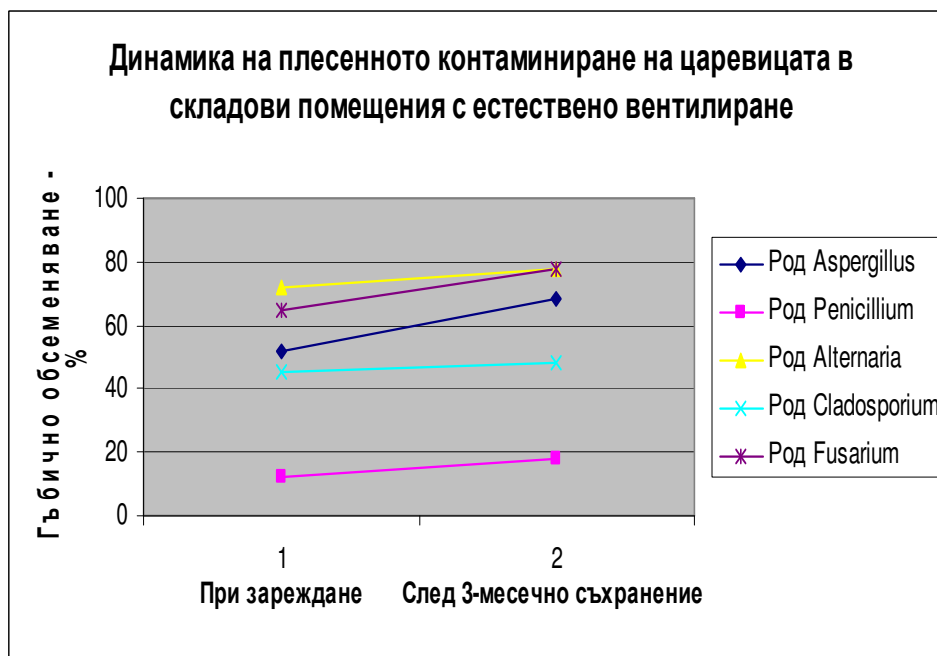
Пробите царевича бяха обсеменени със спори на плесени от род *Aspergillus* – 58% (в т.ч. *A.flavus* – 52%, *A.fumigatus* – 45%, *A.niger*-32%), от род *Penicillium* – 46%, от род *Alternaria* – 78% *Trichoderma lignorum* – 42%, *Cladosporim* 35%, *Mucor* и *Rhisopus* – 55%, от род *Fusarium* – 79%.

Беше установена по-висока от първоначалната фузариозна обсемененост, с преобладаване на вида *F. moniliforme*, доказваше се и *F. graminearum*.

Подобна динамика се наблюдаваше и по отношение на видовете от род *Aspergillus* – *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, род *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*.



Фиг. 21 Динамика на плесенното контаминиране на царевичата в складови помещения с активно вентилиране



Фиг. 22 Динамика на плесенното контаминиране на царевичата в складови помещения с естествено вентилиране

Резултатите от извършените микотоксикологични изследвания на пробите царевича, взети непосредствено след прибирането им от полето показваха, че при 68 % от тях се доказва наличие на фузариотоксина

фумонизин. Анализирайки резултатите от присъствието на фумонизините като естествени замърсители на тази зърнена култура, беше констатирано, че през отделните години (2000-2004) количеството им варира в граница от 0,350 до 1,700 ppm. При микотоксикологични изследвания на пробите царевица, непосредствено след прибирането им от полето, бе установено, че в 28 % от тях се доказва едновременно присъствие на зеараленон и фумонизини.

Резултатите от микотоксикологичните изследвания ни дават основание да изкажем становището, че фумонизините могат да се продуцират по време на зреене и вегетация на царевичното зърно. До настоящите изследвания ние не разполагахме с данни за продуцирането на фумонизини в царевицата, произведена у нас.

Получените резултати не ни дават възможност да направим категорично заключение, влияят ли климатогеографските особености на отделните региони у нас - СИБ, ЮБ и СБ и къде съществуват по-благоприятни условия за продуциране на фумонизини.

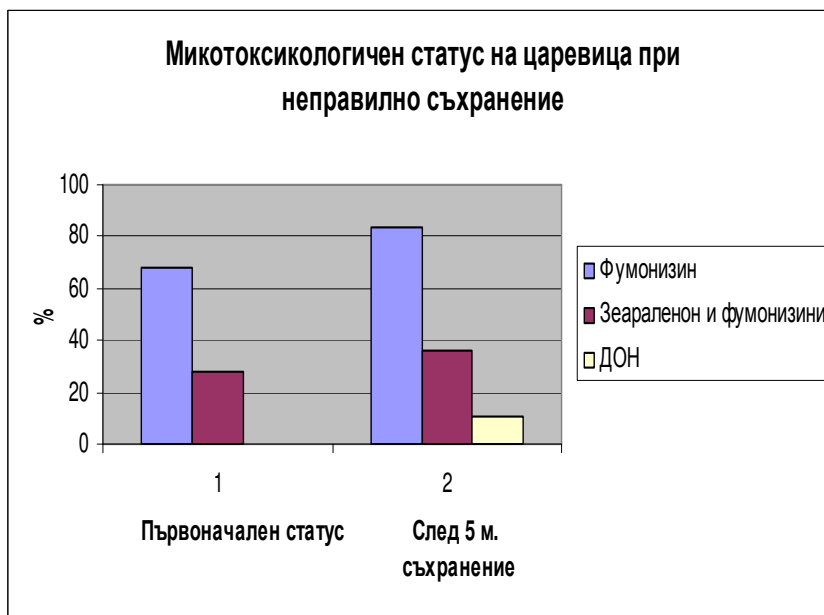
Същевременно в тези проби не бяха доказани други фузариотоксини (дезоксиниваленол и Т-2 токсин) афлатоксини и охратоксини.

Микотоксикологичният статус на пробите, взети от складови помещения след 4-5 месечно съхранение, с оптимални условия на съхранение не се установяват процеси на допълнително плесенно обсеменяване и токсинообразуване. Установените количества на фумонизини и зеараленон остават почти непроменени и са в първоначалните стойности. При микотоксикологичните изследвания не беше доказан и допълнително продуциране на афлатоксини, охратоксини и фузариотоксините – ДОН и Т-2 токсин.

Интересни са резултатите от **микотоксикологичните** изследвания, на пробите царевица, взети от складови помещения не отговарящи на изисквания на технологията за оптимално съхранение на зърното. При тези проби беше доказано, че 36 % от тях са контаминирани с фузариотоксина зеараленон, в процеса на съхранението в количество от 0,180 до 2,6 ppm, а 11 % - с дезоксиниваленол, в количество от 0,100 до 1 ppm. В значителен процент от пробите - 35 %, се установяваше едновременно присъствие на двата токсина – фумонизин и зеараленон в различно съотношение (фиг.

Най-същественото при тези изследвания беше установеното допълнително продуциране на фумонизини. Анализите показаха, че с около 16 % са се увеличили първоначално установените проби с наличие на фумонизини. Едновременно с това се доказваше, че съдържанието на фумонизини е завишено неколкостратно и достигаше до стойности от 6-7 ppm (Фиг.23).

Получените резултати ни дават основания да приемем, че гъбичката *F.moniliforme* може да продуцира допълнително фумонизини при съхранение, но определено считаме, че този фузариотоксин се образува предимно по време на растеж и вегетация на царевичното зърно. В условията на съхранение на царевичното зърно микроскопичната гъбичка *F. moniliforme* може да продуцира в значителни количества дезоксиниваленол и зеараленон. Фактите подчертават значението на правилното съхранение на зърното с оглед недопускане на допълнително плесенно контаминиране и продуциране на микотоксини.



Фиг. 23 Микологичен статус на царевица при неправилно съхранение

3.1.4 Проучвания относно микологичния и микотоксикологичен статус на царевица на зърно, реколта 2005-2006 г

В периода 2005-2006 г. бяха изследвани 124 представителни проби царевица на зърно от различни региони на страната – СИБ, СИ, ЮБ с цел установяване степента на контаминиране с плесени от род *Fusarium* и изолиране и проучване възможностите на вида *F. moniliforme* за продуциране на фумонизини. При извършените микологични изследвания беше установено, че няма съществена разлика във видовия състав на плесенната флора. Тя запазва видовото си разнообразие, характерно за нашия климатичен регион - изолираха се плесенни видове от род *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*), род *Penicillium*, род *Alternaria* и по-малко от род *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*. Същественото при тези изследвания беше, че се доказва висок процент на поразеност с плесени от род *Fusarium* – от изследваните 124 проби царевица в 84 от тях доказахме плесени от род *Fusarium* (около 68 %). Преобладаваше видът *F. moniliforme* – в 76 от пробите (около 90 %) беше доказан този плесенен вид. Само в единични проби се установяваше растеж на *F. graminearum* или *F. tricinctum*.

При културелните изследвания на пробите царевица не беше доказан растеж на други видове фузариуми - *F. proliferatum*, *F. fujicoroi*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* и др., отговорни за продуцирането на фумонизини. Получените от нас резултати потвърждават становището, че микроскопичните гъбички от род *Fusarium*, и по-конкретно видът *F. moniliforme* в най-висока степен поразяват тази зърнена култура, произведена у нас.

При тези изследвания бе установено, че няма съществена разлика в степента на обсеменеността на царевицата с *F. moniliforme*, произведена в различни региони на България - СИБ, СБ и ЮБ. Резултатите от извършените микологични проучвания на царевицата, ни позволяват да направим извода, че у нас преобладава видът *F. moniliforme*, който има пряко отношение към токсинообразуването. Това вероятно се дължи на високата токсигенна активност на този фузариумен вид.

При извършените микотоксикологични изследвания на пробите царевица, беше установено че при 52 % от тях с доказана обсемененост с вида *F.moniliforme* се установява наличие на фузариотоксина фумонизин в количество до 15 – 16 ppm. Анализирайки резултати от присъствието на фумонизините, като естествени замърсители на тази зърнена култура, реколта 2005-2006 г сравнени, с установените количества при предходните изследвания (2000 - 2004) беше установено, че количеството им варира от минимални (0,3 ppm) (Борисова, 2005) до значителните при настоящите изследвания (фиг. 24).



Фиг. 24 Съдържание на фумонизини в царевица

От направените анализи можем да обобщим, че видът *F.moniliforme* е основен продуцент на фумонизини. на царевицата, произведена у нас. Тази зърнена суровина се явява подходящ субстрат за продуциране на тези фузариотоксини и съдържанието им може да се движи в широки граници.

3.1.5 Проучвания върху микологичния и микотоксикологичен статус на царевица и пшеница на зърно, реколта 2007-2008 г

В периода 2007-2008 г бяха изследвани 114 представителни проби, в т.ч.50 от царевица и 64 от пшеница, произведени в различни региони на страната. При извършените микологични изследвания, на проби царевица и пшеница, реколта 2007 г. , взети от различни региони на страната - СИБ, СБ и ЮБ.

При микологичните изследвания беше установено, че няма съществена разлика във видовия състав на плесенната флора. При пшеницата традиционно бяха доказани плесени видове от род *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Cladosporium* (Борисова, Л. и кол., 2000, Борисова, Л., 2005,a). При царевицата беше установена подобна микологична находка, с изключение на плесените от род *Alternaria*, които се доказваха в единични проби.

Пробите царевица, взети непосредствено след прибирането им от полето бяха контаминирани със спори на плесени от род *Aspergillus* – 71% (в т.ч. *A.flavus* – 90-95%, *A.fumigatus* – 35%, *A.niger*-32%, *A.tereus* – 12%, *A.nidulans*), от род *Penicillium* – 26%, от род *Alternaria* – 8% *Trichoderma lignorum* – 12%, *Cladosporim* 37%, *Mucor* и *Rhisopus* – 47%, от род *Fusarium* – 33-35%.

Резултатите от микологичните изследвания на пробите царевица, взети непосредствено след прибирането им от полето показваха, значителна степен на обсемененост с плесени от род *Aspergillus*. При културелните изследвания на пробите се доказваше растеж предимно на вида *A. flavus*. Доказваше се и растеж на видовете *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* и само в единични проби *A. nidulans*. Процентът на пробите поразени с *A. flavus* се движеше в значително високи граници – от 40-50% до 90-95 %. По-висок беше процентът на пробите царевица, обсеменени с този вид микроскопична гъбичка.

Пробите пшеница бяха контаминирани със спори на плесени от род *Aspergillus* – 67% (в т.ч. *A. flavus* – 90-95%, *A. fumigatus* – 33%, *A. niger* – 29%, *A. terreus* – 12%,), от род *Penicillium* – 31%, от род *Alternaria* – 78%, *Trichoderma lignorum* – 8%, *Cladosporium* 27%, *Mucor* и *Rhizopus* – 45%, от род *Fusarium* – 35%.

Не се наблюдаваха съществени различия по отношение степента на обсеменяване на пробите с *A. flavus*, произхождащи от различните зърнопроизводителни райони на страната. Най-същественото при извършените микологични изследвания беше установеното от нас, че и двата субстрата – пшеница и царевица, реколта 2007 г. беше поразена от токсичната плесен *A. flavus*. При анализиране на резултатите от извършените микологични изследвания и доказаната висока степен на обсемененост с *A. flavus* едновременно при царевицата и пшеницата е факт, които се наблюдава за първи път през периода на нашите изследвания.

При извършените микотоксикологични изследвания на пробите царевица и пшеница непосредствено след прибирането им от полето беше установено, че при около 65 % от тях се доказва наличие на афлатоксини в количество от 2-3 до 8-10 ppm. Обобщавайки тези резултати можем да посочим, че контаминирането на пшеницата и царевица на полето, с *A. flavus* се създава възможност за продуциране на афлатоксини. От получените данни за продуцираните количества на афлатоксини в основните зърнени фуражи, не може категорично да се посочи, пшеницата или царевицата се явяват подходящ субстрат за продуциране на афлатоксини.

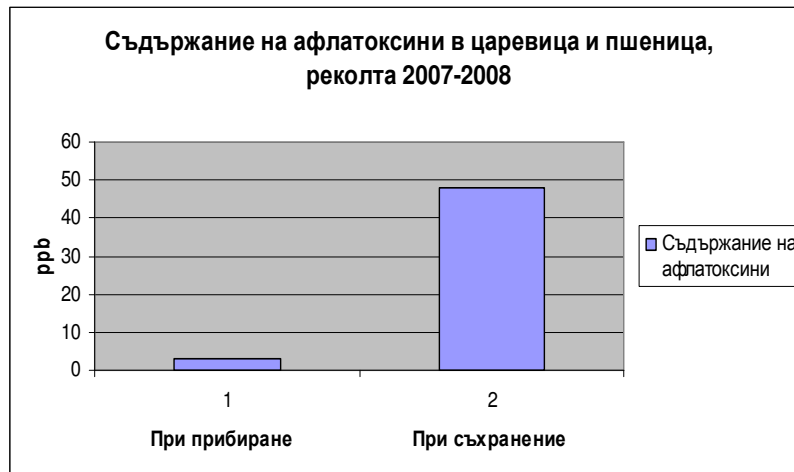
При микологичните изследвания беше установено слабо обсеменяване с плесени от род *Fusarium*, за разлика от предишните години на нашите изследвания. Средно в около 32-35 % от пробите се доказваха фузариумни видове. В пробите пшеница се доказваше предимно растеж на видът *F. graminearum*, а в пробите царевица на *F. moniliforme*.

При микотоксикологичните изследвания на пробите пшеница и царевица, непосредствено след прибирането им полето бяха доказани фузариотоксините дезоксиниваленон и зеараленон в около 16 % от изследваните проби в количества значително по-ниски от установените до сега. Не се доказваше наличие и на охратоксин А.

При извършените микологични изследвания на пробите царевица и пшеница по време на съхранението им беше установена същата зависимост – запазваше се високата степен на поразеност с *A. flavus*. Доказваха се и видовете *A. fumigatus*, *A. niger*, но в незначителни стойности. При тези изследвания не се установяваше динамика в качествения и количествен състав на плесениата флора от род *Fusarium*. При културелните изследвания на пробите царевица се изолира вида *F. moniliforme*, а при от пробите пшеница *F. graminearum*.

При извършените микотоксикологични изследвания на пробите царевица и пшеница по време на съхранението им беше установено, че при около 68-70 % се доказваше наличие на афлатоксини в количество между 20-30 ppb. Само в

единични проби се установяваха количества между 40-50 ppb. При сравняване на процента на пробите, около 65 % при първоначалното изследване (непосредствено след прибиране на зърното от полето), съдържащи афлатоксини и доказания процент при няколко месечно съхранени – 68-70 % се установява, че разликата не е съществена. Обобщавайки тези резултати можем да посочим, че по време на съхранението е станало допълнително продуциране на афлатоксини – фиг.25.



Фиг.25 Съдържание на афлатоксини в царевица и пшеница, реколта 2007-2008 г.

Резултатите от извършените микологични и микотоксикологични изследвания на царевицата и пшеницата, ни дават основание да изкажем становището, че високата степен на обсемененост с гъбичката *A. flavus* е пряко свързана с продуцирането и доказването на афлатоксини в тях. Резултатите от тези изследвания ни разкриват възможността на този вид токсична плесен да продуцира афлатоксини при определени условия, както на полето, така и по време на съхранението при нашите условия.

От получените резултати може да се направи извода, че микроскопичната гъбичка *A. flavus* е основен контаминант на царевица и пшеницата, произведена у нас, реколта 2007-2008 г. и притежава способността за продуциране на афлатоксини.

ОБСЪЖДАНЕ

Пшеницата и царевицата като компоненти на фуражните смеси, предназначени за изхранване на различни видове и категории продуктивни животни участват винаги и повече от 50%. Това създава реална възможност при контаминирането им с токсични плесенни видове и микотоксини, дори в ниски, подпрагови концентрации за появата на скрито протичащи микотоксикози. През последните години бяха наблюдавани болестни състояния, при свине и птици, не винаги с изяснена етиология, разнообразна клинична картина и с вероятната намеса на микотоксините.

У нас проблемът за наличието на микотоксини във фуражите и необходимостта от техният контрол се обуславя главно от високата фузариозна поразеност на зърнените култури /Димитров, 1980/. В тази връзка изключително

актуално е заключението на учените, “че вторичните метаболити на плесените от род Фузариум, поради широкото си разпространение и висока токсичност, вероятно са с по-голямо значение от тази на афлатоксините” (Global perspective of mycotoxins, 1977). Те са актуални както за повечето страни с умерен климат, така и за климатичните условия, в които попада и нашата страна. В този смисъл не трябва да се подценява и ролята на плесените от род *Aspergillus* и *Penicillium*, като се има предвид тенденцията за затопляне на климата в Европа /Мишев, Пл., М.Мочурова, 2009/ потенциални продуценти на микотоксини, с остро токсично, дори канцерогенно действие.

Проучванията, които проведохме върху микологичния и микотоксикологичен статус на основните зърнени фуражи – пшеница и царевица, през последните години, доказаха, че продуцирането на микотоксини е динамичен процес, който зависи от множество фактори.

При прегледа на литературните данни за изследванията върху микологичния статус на пшеницата и царевичата, произведена у нас беше установено, че през отделни периоди от няколко години (7-10 години) се наблюдава преобладаване на един или няколко токсични плесенни вида, които определят и микотоксикологичния статус на добитото зърно. В тази връзка сравнени с останалите контаминанти на фуражните суровини, микотоксините са особено проблематични и могат да предизвикат конфликтни и объркващи симптоми в патологията на животните.

При проследяване на микологичния и микотоксикологичен статус на пшеницата в период от 1995 – 2005 г от основните зърнопроизводителна района на страната – СИБ, СБ и ЮБ бе установено, че няма съществена разлика във видовия състав на плесенната флора. Микроскопичните гъбички бяха представени главно от род *Fusarium* (с преобладаващи видове *F.graminearum*, *F.moniliforme*, *F. tricinctum*), от род *Aspergillus* (с видовете *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.clavatus*), от род *Penicillium* (с вида *P.viridicatum*), род *Alternaria* (с *Al.tenuis*), *Cladosporium* sp., *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*. Същественото при тези изследвания беше, че пшеницата произведена в СИБ в сравнително по-висока степен е контаминирана с плесенни видове, продуценти на фузариотоксини в сравнение с този добит в ЮБ. Характерно за пшеницата от СИБ бяха високите нива на обсеменяване с *F. moniliforme* и *F. graminearum*. Веднага трябва да подчертаем, че тези видове фузариуми са продуценти на богата гама микотоксини – зеараленон, дезоксиниваленол, Т-2 токсин, включително и фумонизини - фузариотоксини с различно биологично действие, играещи съществена роля в патологията на продуктивните животни.

Вероятно една от съществените причини за високата степен на поразеност на пшеницата от СИБ с плесените от род *Fusarium* са особеностите в климатогеографските условия на този регион – почва, релеф, резки температурни колебания в атмосферните денонощни амплитуди, с отключващ фактор колебанията във валежите, характеризиращи се с екстремни валежни явления, главно в периода на вегетация и прибиране на зърното. Получените от нас данни за високата степен на фузариозна обсемененост са сходни със съобщенията на Vrabcheva et al., (1996), които установяват, че 83 % от пшеница, реколта 1995 г е поразена между 20 и 60% с представители от род *Fusarium*. Тези констатации потвърждават особеното значение, което имат видовете фузариуми като основни замърсители на зърнените култури в районите с умерено континентален климат, в които попада и тази част на страната ни (Dimitrov and Nicolcheva, 1983; Nenov and Dimitrov, 1992).

Същественото при микотоксикологичните изследвания на пробите пшеница, в периода 1995-1999г, непосредствено след прибирането им от полето е, че те не съдържат наличие на фузариотоксини /зеараленон, дезоксиниваленол, Т-2 токсин/, независимо от високата степен на поразеност с фузариуми. В тези проби не беше доказано наличие и на афлатоксини и охратоксини.

Приема се, че фузариозната обсемененост на пшениченото зърното по време на прибирането му е показател, който определя и състоянието му по време на съхранението. Зърно, с висока степен на фузариозна обсемененост е особено чувствително на всяко отклонение от оптималните параметри на съхранение – температура, влага, аерация и реагира с допълнително плесенно контаминиране и продуциране на микотоксини.

В потвърждение на тези разсъждения са установените резултати от микологичните изследвания след тримесечно съхранение в различни типове складови помещения – плоски складови помещения, силосни кули и метални клетки с оптимален температурно-влажностен режим. Установява се характерната динамика в количествения и качествен състав на плесенната флора – значително намаляване на процента на т.н. “полеви плесени”, към които спадат основно тези от род *Fusarium*, а също така и от род *Alternaria*, *Cladosporium*, за сметка на т.н. “складови плесени” – предимно от род *Aspergillus* / най-чести представители *A.flavus*, *A. fumigatus*, *A.niger*/ и род *Penicillium*, но те не надхвърлят първоначално установените стойности.

Чувствителни разлики в състава на плесенната флора бяха установени в пробите пшеница, взети от складови помещения, в които не бяха спазени технологичните изисквания на съхранение /поставено зърно с по-висока от стандартната влажност, липса на вентилация, аерация, колебания в температурата на зърнената маса, образуване на кондензна влага/. Културелните изследвания на проби пшеница от такива партии, показваха висока степен на фузариозна поразеност. Едновременно с това, при микотоксикологичните изследвания беше доказано, че по време на съхранението са продуцирани фузариотоксините дезоксиниваленол и зеараленон. Доказваше се наличие на ДОН в количество от 0,095 до 270 ррв, а на зеараленонон в количество от 50 до 1350 ррв/. Наличие на Т-2 токсин беше установено в еденични проби със силно дефектирани зърна.

При подобни проучвания и на други автори /Perkowski et al., 1990, Sobolev and Eller, 1990/ се потвърждават установените от нас резултати – условията на съхранение са фактор имащ съществено значение при контаминиране на зърнените фуражи с микотоксини. Авторите подчертават и за възможността за едновременно присъствие на дезоксиниваленол и зеараленон, което беше потвърдено и при нашите изследвания. Все по често в литературата се срещат съобщения за едновременно присъствие на два или повече микотоксина, което по-рано се приемаше за невъзможно.

При тези изследвания не може да бъде пренебрегнат и факта за установяването на охратоксин А / в значителни количества – от 76 до 121 ррв/, изключително в пробите от СИБ.

Проведените изследвания в периода 1995-1999 г за установяване на микологичния и микотоксикологичен статус на пшеницата, произведена у нас, потвърждават становището, че фузариозната поразеност е висока (особено за района на СИБ), но фузариотоксините се продуцират изключително по време на съхранение на зърното.

Следователно не общата фузариозна обсемененост, а изолатите, продуценти на фузариотоксини, поставени при конкретни условия на съхранение имат определящо значение за продуцирането на фузариотоксини. Установените резултати показват категорично необходимостта от постоянен контрол върху тези естествени контаминанти на пшениченото зърно, създаващи потенциална опасност за здравето и продуктивността на продуктивните животни.

Крайно неблагоприятните климатични условия през 2005 г. в редица райони на страната по време на растеж, вегетация и прибиране на пшеницата / екстремни валежни явления / благоприятстваха развитието на заболяването “фузариоза”, в резултат на което в почти 100 % от пробите се доказваше контаминиране с микроскопичните гъбички *F.graminearum* и с *F. moniliforme*. Анализирайки резултатите от извършените микологични изследвания бе потвърдено становището, че микроскопичните гъбички от род *Fusarium*, при благоприятни за тях условия поражават масово зърнените фуражи още на полето, в процеса на тяхното развитие и зреене. Същественото при тези изследвания беше и наблюдаваната друга особеност – т.н. “скрита фузариоза”. Зърната от които масово се изолираше Ф.гр. бяха с нормални органолептични показатели – цвят, големина, структура на паренхима и зародиша. По повърхността им не се наблюдаваха видими плесенни обложения и оцветявания. Това ни даде възможност да предположим, че пшениченото зърно е било поразено от паразитните плесени в по-късен стадий от своето развитие.

До 1961 г. заболяването “фузариоза” не е познато у нас, след което при определени условия започва да се появява в по-голям или по-малък размер и е един от факторите, които определят качеството на добитото пшеничено зърно. При изследване на микотоксикологичния статус на зърното, добито от тази реколтна година, непосредствено след прибирането му от полето, беше установено едновременно присъствие на ДОН / в количество до 3,5 ppm/ и зеараленон /в количество до 1,5 ppm/. Същественото при тези изследвания беше, че не се наблюдава зависимост между степента на обсеменяване с един или друг токсичен фузариумен вид и количеството на продуцираните токсини. Тези данни за биосинтез на фузариотоксините по време на растеж и вегетация на пшениченото зърно, не съвпадат с установените от нас до сега резултати за периода 1995-1999 г., които показват продуциране на микотоксини изключително по време на съхранение на зърното. Това ни дава възможност да се изкажем становището, че при определени условия паразитните фузариуми придобиват висок токсичен потенциал за продуциране на токсични продукти в значителни количества в пшениченото зърно още на корен, на полето. Установените нива на микотоксини при тези първоначални изследвания са значително високи. Това е сигнал, че при съхранението на пшеницата (до нова реколта) и при пропуски в технологичните изисвания на съхранение може да се стигне до допълнително плесенно контаминиране и продуциране на значителни количества на микотоксини.

При проучванията на микологичния и микотоксикологичен статус на пшеницата и царевичката в периода 2007-2008 г. беше установено, че тези зърнени култури са масово обсеменени с вида *A. flavus* и контаминирани с афлатоксини. Това беше факт, който може би за първи път се установява у нас (Борисова и кол. 2008). Въпреки, че е доказано повсеместното разпространение на *A. flavus* в различни географски ширини, включително и у нас (Станкушев, Х., 1963), днес определено се счита, че поясите с тропически и континентален климат са много по-благоприятни за целогодишно образуване на афлатоксини.

Относителна влажност на въздуха над 80%, температура над 25°C, наличието на кислород и неутрално рН на почвата се сочат като основни фактори определящи развитието на микроскопичните гъбички, продуценти на афлатоксини и процесите на токсинообразуване. При изследване на микопейсажа на зърнените фуражи у нас – пшеница и царевица през различните годишни периоди, се установява, че *A. flavus* е един от най-често преобладаващите видове гъбички от род *Aspergillus*, поразяващ от 20 до 75% от тези зърнени култури Борисова, Стакушев /. Независимо от контаминирането им с *A. flavus*, липсват литературни данни за продуцирането на афлатоксини в зърнените фуражи, произведени у нас. До настоящите проучвания ние считаме, че щамовете на *A. flavus*, изолирани от фуражите, произведени у нас, не притежават токсигенен потенциал.

Последните проучвания извършени от нас върху микотоксикологичния статус на пшеницата и царевицата, реколта 2007 г показаха масово обсеменяване с микроскопичната гъбичка *A. flavus*, като едновременно с това се доказваше и наличие на афлатоксини. Анализирайки данните по отношение на микологичния и микотоксикологичен статус на пшеницата и царевицата, за един сравнително дълъг период (1995-2005 г) и реколта 2007 г може да се обобщи, че едновременно с плесените от род *Fusarium*, които ги считаме за постоянни контаминанти и продуцираните от тях токсини се намесват и афлатоксините, което потвърждава становището от необходимостта на постоянен контрол върху тези биологични контаминанти. Вероятно това се дължи на способността на токсичните плесенни видове, като всички живи същества да притежават способността за изменчивост, степен на паразитна адаптация и еволюционна насоченост. Този факт вероятно може да се обясни с редица причини, но безспорно една от най-важните е промяната в глобалните климатични условия, които могат да доведат до развитие на токсични плесенни видове, а оттам и до продуциране на широка гама микотоксини, в т.ч. и на афлатоксини (D'Mello, 1999, 2000, 2001). За подобни възможности съобщават и други автори, които посочват, че в умерените региони при високи летни температури се създават условия за контаминиране на фуражите с *A. flavus* и продуциране на афлатоксини (Weckbach, L., 1977). Изключение в това отношение са най-студените области на Северна Европа и Канада (D'Mello, 2001).

При микотоксикологичните изследвания на пробите царевица и пшеница бе установено, че при около 65% от тях се установява наличие на афлатоксини в количество от 2-3 ppb, най-често 8-10 ppb, а в отделни проби до 40-50 ppb. Анализирайки тези резултати, можем да обобщим, че контаминирането на пшеницата и царевицата с вида *Asp. flavus*, създава потенциална опасност за продуциране на афлатоксини, а от там за здравето и продуктивността на селскостопанските животни.

Важен момент при тези изследвания беше и установеното, че афлатоксините се доказват както в току-що прибраното зърно, така и след няколко месечно съхранение. До сега ние приемахме, че афлатоксините за нашите климатични условия могат да бъдат проблем само при неправилно съхранение на зърното, тъй като се синтезират от т.н. "складови плесени", към които принадлежи и *Asp. flavus*. От получените данни за наличието на афлатоксини в тези зърнени култури не може да се посочи, пшеницата или царевицата се явяват по-подходящ субстрат за биосинтеза на афлатоксини. В литературата съществуват данни, които посочват, че при царевицата възможността за натрупване на токсина на полето е значително по-голяма, в

сравнение с пшеницата поради по-продължителния период на въздействие на високите летни температури, - оптимални за продуциране на афлатоксини. Редица автори считат, че царевичата се явява по-подходящ субстрат за продуциране на този микотоксин, но те не съвпадат с установеното от нас (Борисова, Л., и кол., 1999, 2004, 2005,b).

Получените резултати по отношение на микологичния статус на пшеницата и царевичата се наблюдават за първи път от десетина години, период в който преобладаваше изключително контаминирането с плесени от род *Fusarium* (Борисова и кол. 2000, 2005, a).

Проведените микологични и микотоксикологични проучвания ни дават основание да изкажем становището, че микроскопичната гъбичка *Asp. flavus*, изолирана от пшеницата и царевичата, притежава токсигенен потенциал и е пряко свързана с продуцирането на афлатоксини в тях. Вероятно за афлатоксинообразуването в изследваните субстрати при естествени условия има значение и взаимодействието на *Asp. flavus* с другите плесенни видове, както от род *Aspergillus*, така и от род *Penicillium*, *Fusarium* и др. Най-много привърженици има идеята за биологична конкуренция между щама продуцент и съпътстващата микофлора.

Weckbach и Marth, (1977) отбелязват значително потискане на афлатоксинопродукцията от *Rhizopus nigricans* и рязко повишаване синтеза на афлатоксини в присъствието на плесени от род *Penicillium*. Все още малко се знае за механизмите, с които епифитната микрофлора влияе върху биосинтезата на микотоксините. Може да се предположи, че отделни плесенни видове при своето развитие отделят вещества, които се намесват в механизма на вторичния метаболизъм при биосинтеза на микотоксините.

От получените данни върху микологичния и микотоксикологичен статус на основните зърнени култури пшеница и царевича, реколта 2007 г. се утвърждава становището, че микотоксините се явяват потенциално опасни контаминанти, тъй като видовете плесени, които ги обсеменяват, като елементи на една цялостна екологична система, в която въздействат множество фактори, могат да изменят генетиката си и да придобият значителен токсигенен потенциал.

Проучвания за наличието на фумонизини в царевичата, произведена у нас до 2000 г не са извършвани, поради липса на инструментална апаратура за доказването им. Продуценти на фумонизини са микроскопичните гъбички от род *Fusarium* – *F.moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. fujicoroi*, *F. anthophilum*, *F.dlamini* и др. Те са широко разпространени в природата и са естествени контаминатори на всички зърнени култури в различни географски ширини. Според Nelson (1993) най-често са обсеменени царевичата и просото, отглеждани в по-топлите райони на планета. Беше вече подчертано, че България е в климатичен район, изключително подходящ за развитие на гъбички от род *Fusarium*.

Дългогодишните микологични изследвания на зърнените фуражи, включително и на царевича на зърно, показваха, че видът *F.moniliforme* е преобладаващ и че зърнените култури са обсеменени с тази паразитна гъбичка още на полето. Това ни даде основание да проведем настоящите изследванията в периода 2000-2006 г за да установим степента на поразеност на царевичата, произведена у нас с плесенни видове, продуценти на фумонизини, да установим наличието на токсина, непосредствено след приключване на вегетацията по време на прибиране на зърното от полето, влиянието на съхранението, като

фактор за допълнително образуване на този плесенен метаболит, както и проучване на токсигенния потенциал на изолираните щамове на *F. moniliforme*.

При микологичните изследвания на проби царевича на зърно, взети непосредствено след прибирането от полето, беше установена висока степен на обсемененост с плесенни видове от род *Fusarium*, която през различните години на изследвания период беше различна, но се запазваше относително висока. Преобладаваше видът *F. moniliforme* – в почти 100% от изследваните проби се доказваше този плесенен вид. Само в единични случаи бе установен растеж на вида *F. graminearum* или *F. tricinctum*. Получените резултати потвърждават становището, че микроскопичните гъбички от род *Fusarium*, като паразитни плесени, поразяват зърнените култури още на полето в процеса на тяхното развитие и зреене. При тези наши изследвания беше установено, че няма съществена разлика в обсемеността на царевичата с *F. moniliforme*, произведена в различните региони на България, характеризиращи се със специфични особености в климатогеографските условия, за разлика от тази на пшеницата. При извършените микологични изследвания от нас не бяха доказани други видове фузариуми, продуценти на фумонизини – *F. proliferatum*, *F. fujicoroi* и др., цитирани от автори, провели подобни микотоксикологични проучвания в различни региони на света.

При изследванията върху микологичния статус на царевича, произведена в Испания Arino et al., (2007) също установява, че преобладава вида *F. moniliforme* (*F. verticillioides*) и счита, че е отговорен за наличието на фумонизини. При анализиране на проби царевича от различни провинции в Иран, Ghislan et al., (2006) също стига до извода, че вида *F. moniliforme* е продуцент на доказаните фумонизини. Wang et al., (2000) потвърждават категорично становището, че фумонизините са фузариотоксини, които се продуцират изключително от видовете *F. moniliforme* или *F. proliferatum*.

При анализиране на получените от нас резултати за микологичния статус на царевичата, с публикуваните досега данни от български изследователи, се установява значително увеличаване на фузариозната поразеност през последните десетина години, но това е за сметка на един или два токсични плесенни вида. Интерпретирайки резултатите от микологичните проучвания се установява, че видовата принадлежност на гъбичките от род *Fusarium* се променя в определени периоди. При проведените проучвания от Иванов М., (1980) се установява, че в периода около 70-те години на миналия век, водещо място сред гъбичките от род *Fusarium* заема видът *F. sp. var. tricinctum* (продуцент на фузариотоксините от групата на трихотецените). Малко по-късно при изучаване разпространението на видовете фузариуми по царевичата и способността им да образуват токсични вещества Станкушев и кол. (1977) доказват 12 вида – *Fusarium sporotr. var. poae*, *F. sporotr. var. sporotrichoides*, *F. sporotrichiella*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. latericium*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. gibbosum*, като някои от щамовете образуват токсични вещества, засягащи репродуктивния апарат на опитните животни, като предизвикват некробиотични и дегенеративни изменения в семенниците и аборти (увреждания, характерни за зеараленона), без да могат да ги докажат по химичен път. Други видове фузариуми проявяват тропизъм към храносмилателната система, черния дроб, бъбреците, сърцето, предизвикват силни хемодинамични разстройства и дегенеративни промени (увреждания, характерни за фузариотоксините от групата на трихотецените).

През периода 1980-1990 г на преден план излиза видът *F. graminearum*, с най-голямо значение за продуцирането на фузариотоксина зеараленон, с

наличието на които във фуражите се свързват наблюдаваните репродуктивни смущения при промишленото свиневъдство. Тези данни се потвърждават и от проучванията на Попова (1985) за зеараленон-продуциращата способност на *F.graminearum*. За период от 10-на години настъпва ново разместване във видовото разпределение на гъбичките от род *Fusarium* – преобладава видът *F.moniliforme*, след него следва *F.graminearum*. За подобни резултати се съобщава и в изследванията на Танков Д. (2000) за периода 1995-2000 г.

Проведените от нас микологични проучвания ни дават възможност да направим извода, че у нас преобладава видът *F.moniliforme*, които има пряко отношение към токсинообразуването на фумонизини. Безспорно у нас съществуват условия подходящи за развитие на паразитни гъбички по царевичната, предимно с т.н. "полев плесени", към които спада и вида *F.moniliforme*. В тази връзка не на последно място трябва да се постави и токсигенния потенциал на гъбичката продуцент на микотоксини. Известно е, че присъствието на микроскопичните гъбички не е достатъчно условие за продуциране на микотоксини. Необходими са редица екоклиматогеографски фактори за иницирани на токсинообразователния процес.

Тук трябва да посочим, че този плесенен вид може да образува и фузариотоксина зеараленон. В около 28% от изследваните проби царевична в периода 2000-2004 г се установява едновременно присъствие на зеараленон и фумонизин. Тези данни за едновременно контаминиране на царевичната със зеараленон и фумонизин, се потвърждават и от други автори Logrieco et al., (2002)Magan, N., Disen, M., 2004

Взаимодействието между динамиката на развитие на различните видове фузариуми и комплекса от фактори, които им влияе, вероятно е много сложен. През различните години тези фактори са се променяли, което е довело до видово разместване и преобладаване на един или друг вид фузариум, а от там и на микотоксикологичния статус на добитото зърно.

Независимо от преобладаването на един или друг вид фузариумен вид, получените от нас резултати съвпадат с тези на други изследователи, които потвърждават становището, че микроскопичните гъбички от род *Fusarium* са основен замърсител на тази зърнена култура. Очевидно, както се наблюдават промени във фузариозната обсемененост на зърнените култури през годините, така и способността на щамовете да продуцират фузариотоксини също търпи промени в различните реколти. Тук влизат освен метериологичните особености, определящи се от климатогеографските дадености на региона, така и фактори, свързани с културата и възможностите на прилаганата агротехника. В природата температурата и влагосъдържането на субстрата (като функция от относителната влажност на въздуха) са елемент на една цялостна екологична система, в която действуват и редица други фактори.

Съществен момент при извършените микологични и микотоксикологични изследвания е установеното, че биосинтезата на тези фузариотоксини е проблем при развитието на царевичното растение, на полето. При 52% от пробите с доказана обсемененост с вида *F.moniliforme* се установява наличие на фузариотоксина фумонизин в количество до 15-16 ppm. Анализирайки резултатите за присъствието на фумонизините като естествен замърсител на тази зърнена култура, можем да посочим, че количеството на тези микотоксини нараства значително в сравнение с установените при първоначалните изследвания / от 350 – 1700 ppm/. От направените анализи можем да обобщим, че царевичната се явява подходящ субстрат за образуване на фумонизини, независимо от това, че съдържанието му през годините се движи в

широки граници. Доказаните от нас, при тези изследвания, количества на фумонизини се правят за първи път у нас и показват, че успоредно с другите фузариотоксини – зеараленон и дезоксиниваленол, те се срещат като естествен замърсител на тази зърнена култура. Вероятно причина за наблюдаваните в практиката инциденти при свине и птици са с намесата на съдържащите се в царевичната фумонизини.

Проведените микологични и микотоксикологични проучвания потвърдиха значението на правилното съхранение на фуражите. При оптимални параметри на съхранение – стабилен температурно влажностен режим, аерация, предпазване от складови вредители, процентът на т.н. ”полевни плесени”, към които спадат и токсинообразуващите гъбички от род *Fusarium* значително намаляват.

Чувствителни промени в качествения и количествен състав на плесенната находка се установяват в пробите царевича, взети от партиди, неправилно съхранени – липса на вентилация и аерация, образуване на кондензна вода и пр. При тези условия се установява допълнително синтезиране на фумонизини в значителни количества – първоначално установени 8-9 ppb се стига до 40-50 ppb. Доказаните изменения потвърждават становището, че съхранената зърнена маса представлява лабилна система, реагираща на минимални отклонения в условията на съхранение, с промени в качествения и количествен състав на плесенната флора и с натрупване на токсични плесенни метаболити. Това ни дава основание да приемем, че *F.moniliforme* може да образува фумонизини и при неправилно съхранение на зърното, но определено смятаме, че този фузариотоксин се образува предимно по време на растеж и вегетация на царевичното растение.

В условията на съхранение на царевичното зърно *F.moniliforme* може да продуцира в значителни количества зеараленон и дезоксиниваленол. Може да се предположи, че видът *F.moniliforme* при нашите условия е способен да образува едновременно фумонизин и зеараленон в значителни количества. Все по-често в литературата се срещат съобщения за присъствието на два или повече фузариотоксина в различно съотношение, което по-рано се приемаше за невъзможно (Nelson et al., 1993). Това потвърждава становището, че един вид микроскопична гъбичка, притежаваща висок токсигенен потенциал може да образуват няколко токсина. Високата степен на обсемененост на царевичната с *F.moniliforme* е сигнал, че съществува възможност за образуване на един или няколко плесенни метаболита, заемащи съществена роля в патологията на продуктивните животни. Това налага извършването на постоянен микологичен и микотоксикологичен контрол на царевичната, както по отношение съдържанието на фумонизини, така и за другите фузариотоксини – зеараленон и дезоксиниваленол, с оглед ограничаване на потенциалния риск за здравето на животните и хората.

При анализиране на резултатите от извършените микологични и микотоксикологични проучвания на основните зърнени суровини, произведени у нас – царевича и пшеница в периода 1995 – 2008 година, може да бъде обобщено, че факторите, които определят контаминирането с микотоксини, подредени по значимост са:

- климатогеографските особености на района на производство,
- екстремните валежни явления по време на цъфтеж и вегетация на растенията;
- агротехническото обслужване;

- общата поразеност на фуражните растения с плесенни видове, продуценти на микотоксини;
- генетиката на щамовете, способни да продуцират микотоксини;
- условията и режима на съхранение.

Комбинираното въздействие на тези фактори обуславя различията в степента на контаминиране както по реколтни години, така и по климатогеографски райони.

В заключение е необходимо да отбележим, че проблема с микотоксините и микотоксикозите е свързан с големи икономически загуби. Наивно е да се мисли, че фуражите ще бъдат предпазени от контаминанти като токсични плесенни видове и микотоксини, но тук е ролята и мястото на постоянния контрол върху микологичния и микотоксикологичен статус на основните зърнени суровини и произведените от тях фуражни смеси.

V. ИЗВОДИ

1. Видовете микроскопични гъбички, поразяващи пшеницата и царевичната принадлежат към род *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Phisopus*.
2. Пшеницата, произведена в СИБ в значително висока степен е обсеменена с токсичните видове *F.graminearum* и *F.moniliforme* - основни продуценти на фузариотоксините – дезоксиниваленол и зеараленон. Вероятно, една от най-съществените причини за високата фузариозна поразеност в тази част от територията на страната ни, се дължи на климатогеографските особености – резки денонощни температурни колебания, вид почва, релеф, брой слънчеви дни в денонощието и като отключващ фактор се явяват колебанията на валежите и експемните валежни явления по време на цъфтеж, растеж и вегетация на пшеничното растение.
3. Видът *P.viridicatum* може да бъде продуцент на охратоксини А в пшеницата.
4. Микроскопичната гъбичка *F.moniliforme* е основен продуцент на фумонизини в царевичната.
5. Фумонизини се продуцират предимно по време на растеж и вегетация на царевичното зърно.
6. При определени природо - климатични условия по време на растеж и вегетация на царевичната могат да се продуцират едновременно фузариотоксините – зеараленон и фумонизини.
7. Микроскопичната гъбичка *Asp.flavus* е основен контаминант на царевичната и пшеницата, произведена у нас, реколта 2007 г.

IX. ЛИТЕРАТУРЕН УКАЗАТЕЛ

1. Александров, М. 1982. Стахиботриотоксикоза при юници, Вет.сбирка, 2.
2. Александров, М., А. Джуров. 1986. Клинични и патоморфологични промени при пилета бройлери под влияние на охратоксин А. Вет.мед.науки. (под печат).
3. Александров, М. 1987. Влияние на съдържащия се във фуража зеараленон върху кокошки носачки. Научно съобщение, прието за докладване на на XXIII световен конгрес по ветеринарна медицина, Канада, август, 1987.
4. Ангелов, Г., Н. Ибришимов, С. Милашки. 1999. Клиничнолабораторни изследвания във ветеринарната медицина. София.
5. Арчаков, А.И. 1975. Микросомальное окисление. М. Наука, 327
6. Белчев, Л. 1979. Патоморфологични изменения при естрогенен синдром при свине. Вет. мед. науки, 16, 10, 33-39.
7. Билай, В.И. 1977. Фузариин. Киев.
8. Билай, В.И., Н.М. Пидопличко. 1970. Токсикообразующие микроскопические грибы и вызываемые ими заболевания человека и животных. "Наукова думка". Киев.
9. Борисова, Л., М. Дупаринова, Т. Тачева, Д. Тихова. 1985. Промени при лактиращи овце, еднократно приели зеараленон (F-2) токсин, Внедрени новости, 9, 49-53.
10. Борисова, Л. и кол. 1987. Експериментално възпроизведена афлатоксикоза при пилета бройлери. Вет.мед.науки, 7, 87-90.
11. Борисова, Л., Т. Тачева. 1999, Фумонизин - нов фузариотоксин и неговата патогенност. Вет. сбирка, 1-2, 14-16.
12. Борисова, Л., Т. Тачева, Л. Кънчев. 1999. Влияние на зеараленона върху фертилитета при свине-майки. Вет. медицина, V, 3-4, 204-207– Публикация, свързана с хабилитационния труд
13. Борисова, Л., Т. Тачева, Р. Байкушев, 2000. Микотоксикологични изследвания на пшеница от два зърнопроизводителни района на България, Вет. Медицина, №2-3, стр.29-31 – Публикация, свързана с хабилитационния труд
14. Борисова, Л., В. Връбчева, М. Йоцев, И. Вълчев, Ю. Енчева. 2004. Микотоксикологични проучвания на царевица, произведена в България (2000-2003) за наличие на фумонизини., Сб. трудове Пети международен симпозиум „Екология-устойчиво развитие” Враца, 21-22.10.2004, 171-174.
15. Борисова, Л. 2005. Фузариозата по пшеницата, реколта 2005 г. Рисковете за здравословното състояние на животните. ВМ новини, 8, XVII – XX– Публикация, свързана с хабилитационния труд.
16. Борисова, Л. 2005. Микотоксикологични проучвания на царевица за наличие на фумонизини. Вет.медицина, IX, 1-2, 59-62– Публикация, свързана с хабилитационния труд.
17. Борисова, Л. 2005. Фузариоза по пшеницата, реколта 2005 г. Рисковете за здравословното състояние на животните. Вет.мед.новини, 8, 17-20.
18. Борисова, Л., Ю. Ташева, Н. Сертова. 2008. Проучвания върху контаминирането на пшеница и царевица с *Asp. flavus* и определяне на токсигенните й способности за продуциране на афлатоксини. Вет.медицина, XII, 3-4, 60-63. – Публикация, свързана с хабилитационния труд
19. Вълчева, А., 2002. Проучвания на микологичния и микотоксикологичен статус на царевица и пшеница при хранене на свине и птици. Дисертация.

20. Джурова, Й., 1980. Върху клиниката и патоморфологията на някои заболявания на половите органи при безплодни крави и свине. Дисертация.
21. Джурова, Й. 1981. Върху патоморфологичните промени в половите органи на свине, болни и преболеждали от фузариозен вулвовагинит (вулвоедем). Бюлетин за експрес информация, ЦНИВМИ, 6, 6-12.
22. Дилов П., Б. Георгиев, Л. Борисова, К. Стоянов, В. Връбчева, С. Лазарова, Й. Костадинов, К. Киров, М. Александров, Г. Ангелов. 2005. Ветеринарномедицинска токсикология, изд. ЛТУ, ВМФ, София, 592-597.
23. Димитров, Н., А.Томов, Г. Петков. 1951. Стахиботриотоксикоза по конете у нас. Научни трудове, Ветеринарномедицински факултет, 271-282.
24. Димитров, М., 1980. Микопейзаж на зърнените култури – пшеница, царевица и фасул в България. Автореферат на дисертация за присъждане на научна степен д.м.н., София.
25. Дичев, Р. 1988. Проучване върху някои форми и причини за безплодие при промишлено отглеждане на ремонтни свине. Дисертация.
26. Дупаринова, М., Л. Борисова, Т. Тачева, А. Тихова, А. Джуров. 1990. Експериментален хиперестрогенизъм при отбити прасета. Внедрени новости, 7, 25-27.
27. Дупаринова, М., Л. Борисова, Т. Тачева, Д. Тихова, Ал. Джуров, Д. Чотински, 1990. Проучвания върху някои клиничко – биохимични параметри и патоморфологични промени при пилета бройлери, хранени с различни количества Т-2 токсин, Внедрени новости, 7, 28-31.
28. Дупаринова, М., Л. Борисова, Т. Тачева, Д. Тихова. 1990. Влияние на малки количества Т-2 токсин върху здравето на прасета, Внедрени новости, 8, 35-37.
29. Дупаринова, М., Л. Борисова, Т. Тачева, Д. Тихова. 1990. Проучвания за определяне влиянието на зеараленон върху здравето на прасета. Внедрени новости, 9, 21-23.
30. Загорски, Д. 1983. Изследвания върху биологичната характеристика, съхраняването и криоконсервацията на семенна течност от вида *Sus Scrofa F. Domestica*; Докторска дисертация, БАН - ИБИРО, София.
31. Иванов, М. 1980. Микопейзаж на зърнени култури-пшеница, царевица и фасул в България, дисертация, София,
32. Козарева, М., М. Иванов, Р. Еникова, И. Дончева. 1981. Проблеми на микробиологията и микотоксикологията на хранителните продукти. Медицина и физкултура, София.
33. Кравченко, Л., В. Тутельян, А. Позднаков, А. Котик, В. Труфанова. 1984. Морфологические и биохимические изменения у индюшат, вызванные Т-2 токсина. Науч.тех.бюл.Укр.НИИ птицеводство, 16, 30-32.
34. Кънчев, Л. 1981. Хормонална регулация на половия цикъл при кравата. Дисертация, ИБИРО.
35. Кънчев, Л., Ж. Байчев. 2008. Репродуктивна ендокринология. София. “Виденев и син”.
36. Мишев, П., М. Мочурова. 2009. Климатичните промени и земеделието. Земеделие плюс, бр.2, 7-8.
37. Наредба № 21/ 10.02.06г. за ПДК във фуражи.
38. Наредба № 25 за хуманно отношение към експерименталните животни.
39. Петров, Р., 1978. Имунология и имуногенетика. Медицина и физкултура.
40. Поваженко, И.Т., 1964. Стахиботриотоксикоз крупного рогатого скота, Урожай, Киев.
41. Попова Т. 1985. Зеараленон образуващи микроскопични гъбички и

- фактори, влияещи върху неговата продукция. Дисертация, София,.
42. Препоръка на Комисията 2006/576/ЕС относно наличието на deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 toxin и HT-2 и fumonisins в продукти, предназначени за хранене на животни.
43. Регламент 1126/2007 ЕС на Комисията за изменение на Регламент № 1881/2006 за определяне на максимално допустимите количества на някои замърсители в храните по отношение на *Fusarium* токсините в царевичната и царевичните продукти.
44. Станкушев, Х. 1958. Върху жизнеността на *St. Alternans* в почвата. Известия на научно-изследователския институт за незаразни болести и зоохигиена, т.4, 35-38.
45. Станкушев, Х. 1958. Микотоксикологични проучвания върху някои плесени, съпътстващи *St. alternans* на слама. Известия на научно-изследователския институт за незаразни болести и зоохигиена, т.4, 49-60.
46. Станкушев, Х. 1963. Изследвания върху микофлората на царевичната при съхранение за фураж. Известия на научно-изследователския институт за незаразни болести и зоохигиена, т.3, 123-134.
47. Станкушев, Х., К. Съртмаджиев, Р. Христова, А. Томов, В. Вълев, 1965. Стахиботриотоксикоза у овце. Ветеринарномедицински науки, год. II, т. 2, № 1, 11-17.
48. Станкушев, Х., И. Иванов, И. Симов, К. Съртмаджиев, Т. Томов. 1965. Върху една ензоотия на стахиботриотоксикоза у биволи. Ветеринарномедицински науки, год. II, т. 2, № 2, 113-120.
49. Станкушев, Х., 1965. Гъбички от рода *Fusarium* по ечемика и овеса, съхранявани за фураж. Ветеринарномедицински науки, год. II, т. 2, № 10, 989-995.
50. Станкушев, Х., 1969. Микроскопическите гъби на зърнах овса и ячменя, използваемите за зимен корм. Микология и фитопатология. т.3, 268-272.
51. Станкушев, Хр., Н. Спасивцева, 1971. Микози и микотоксикози по селскостопанските животни, Земиздат, 286 – 292.
52. Станкушев, Х., 1973. Плесени и плесенни токсини по фуражите. Национален център, ССА, обзор.
53. Станкушев, Х., М. Александров. 1977. Върху някои поражения при прасетата и свинете майки след изхранване на фузариозно зърно. В Гастроинтестинални заболявания при свинете. Шумен, 1-2 ноември, 140-142.
54. Степушин, А.Е. 1998. Профилактика микотоксикозов. Москва. "Колос".
55. Стоев, С., 2002. Микотоксични нефропатии по селскостопанските животни и човека – диагностика, рискова оценка и хигиенни мерки. Стара Загора.
56. Събев, М. 1997. Инфертилитет при нерези и възможности за прогнозиране на репродуктивните им качества. Ветеринарна медицина, III, № 1-2.
57. Танков, Д. 2000. Проуявания върху микофлората и разпространението на зеараленон и дезоксиниваленон в пшеница и царевича за фуражно производство. Дисертация, София,
58. Тачева, Т. Л. Борисова, М. Герова, П. Белемезов. 1993. Влияние на различни количества зеараленон (F-2 токсин) върху женски прасета. Сб. "Проблеми на диагностиката на болестите по животните в прехода към пазарна икономика", 91-99.

59. Тачева, Т. Л. Борисова, Р. Русев. 1987. Изпитване биологичното действие на F-2 токсина (зеараленон) при женски прасета. Ветеринарна медицина, vol. III, № 1-2, 88-90.
60. Тачева, Т., Л. Борисова, М. Александров. 1983. Проучвания върху някои клинично-биохимични параметри и патоанатомични промени при спонтанно избухнала стахиботриотоксикоза при телета. Втори симпозиум на младите научни работници и специалисти от системата на НПО "Ветеринарно дело", 36.
61. Тачева, Т., Л. Борисова, Р. Русев. 1997. Изпитване биологичното действие на F-2 токсин (зеараленон) при женски прасета. Вет. медицина, III, 1-2, 88-90 – Публикация, свързана с хабилитационния труд
62. Тачева, Т., Л. Борисова, П. Цачев, Е. Софтова. 1999. Естрогенно действие на зеараленона при подрастващи прасета, Ветеринарна медицина, 3-4 – Публикация, свързана с хабилитационния труд.
63. Тачева, Т., Л. Борисова, М. Събев. 1999. Влияние на зеараленона върху качеството на спермата при нерези. Вет. медицина, V, 2, 126-129 - - Публикация, свързана с хабилитационния труд
64. Ташева, Ю. 2006. Клинично-химични изследвания при експериментално възпроизведена фумонизин токсикоза при пилета бройлери. Сборник доклади от научна конференция на ЛТУ "Традиции и съвременност във ветеринарната медицина", София, 203-209.
65. Ташева, Ю., **Л. Борисова**. 2007. Морфологична характеристика на изолираните щамове на *Fusarium moniliforme* от царевица, произведена у нас и възможността ѝ да продуцира фумонизини. Международна научна конференция – гр. Стара Загора – Публикация, свързана с хабилитационния труд
66. Ташева, Ю., К. Генчева, П. Димитров, Н. Ковачев, Е. Гърдева, Р. Тошкова, Л. Борисова, Р. Русев. 2007. Т-клетъчен имунодефицит при пилета с експериментална фумонизин В₁ токсикоза. Вет. медицина, XI, 1-2, 58-62 - - Публикация, свързана с хабилитационния труд
67. Ташева, Ю. 2008. Проучване действието на фумонизин В₁ при пилета бройлери. Дисертация
68. Томов, А., Х. Станкушев, Р. Хаджирадев, Б. Събев. 1958. Към въпроса за стахиботриотоксикозата по конете у нас и мерките за борба срещу нея. Известия на научно-изследователския институт за незаразни болести и зоохигиена, т.4, 25-34.
69. Трисвятский, Л.А. 1975. Хранение зерна. Москва. "Колос".
70. Тутельян, В.А., Л.В. Кравченко. 1985. Микотоксины. Медицина, Москва.
71. Чотински, Д., Л. Борисова и кол. 1990. Влияние на афлатоксин В₁, зеараленон и Т-2 токсин върху растежа и избрани биохимични показатели при пилета бройлери. Научно-техн. конф. с межд. участие "Взаимодействие генотип-среда в птицевъдството". 1990, октомври, Варна.
72. Abdel –Wahab M, Mostafa M, Sabry M, el-Farrash M, T. Yousef, 2008. Aflatoxins as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Egypt, Mansoura Gastroenterology Center study, Hepatogastroenterology, Sep-Oct;55(86-87);1754-9.
73. Abnet, C.C., C.B. Borkowf, Y.L. Qiao, P.S. Albert, E. Wang, A.H. Merrill Jr, S.D. Mark, Z.W. Dong, P.R. Taylor, S.M. Dawsey. 2001. Sphingolipids as biomarkers of fumonisin exposure and risk of esophageal squamous cell carcinoma in China. Cancer Causes Control. Nov; 12 (9) : 821 – 8.
74. Allander, E. 1994. Kashin-Beck disease. An analysis of research and public health activities based on a bibliography 1849-1992. Scand J Rheumatol Suppl. 99:1-36.

75. Alberts, J.F., W.C. Gelderblom, R. Vleggar, W.F. Marasas, J.P. Rheeder. 1993. Production of [¹⁴C] fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* MRC 826 in corn cultures. *Appl Environ Microbiol.* Aug; 59(8):2673-7.
76. Arino, A., T. Juan, G. Estopanan, J.F. Gonzalez-Cabo, 2007. Natural occurrence of *Fusarium* species, fumonisin production by toxigenic strains, and concentrations of fumonisin B₁ and B₂ in conventional and organic maize grown in Spain. *J Food Prot.* Jan; 70 (1):151-6.
77. Bacon, C., J. Robbins, J. Porter. 1977. Media for identification of *Gibbrella zeae* and production of F-2 (Zearalenone). *Appl. Environm. Microbiol.*, 33, 2, 445-449.
78. Bacon, C.W., I.E. Yates, D.M. Hinton, F. Meredith. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ Health Perspect.* May; 109 Suppl.2 : 325 – 332.
79. Barrett, J. 2000. Mycotoxins: of molds and maladies. *Environ.Health Perspect.* 108:A20-A23.
80. Bata, Á., B. Harrach, K. Ujszászi, et al. 1985. Macrocyclic trichothecene toxins produced by *Stachybotrys atra* strains isolated in middle Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(3):678–681.
81. Bauer, J., 1982. Mycotoxikosen in der tierischen produktion-bedeutung und diagnos (eine Übersicht). *Berliner und Mün. Tierarstl. Wschr.*, 95, 10, 30-307.
82. Bauer, J.K., M. Heinritzi, M. Garies, B. Gedek. 1987. Veränderungen am Genitaltract des weiblichen Schweines nach Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen. *Tierarztl. Praxis*, 15, 33-36, 1987.
83. Beardall, J.M., J.D. Miller. 1994. Disease in humans with mycotoxins as possible causes, p.487-539. In J.D. Miller and H.L. Trenholm (ed.), *Mycotoxins in grains. Compounds other than aflatoxin*. Eagan Press, St.Paul, Minn.
84. Bennett J. W., M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, July, p.497-516, Vol.16.
85. Benzoni E, Minervini F, Giannoccaro A, Fornelli F, Vigo D, Visconti A. 2008. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality, *Report Toxicol.* Aug; 25(4):461-7.
86. Berger, T., K. L. Esbenshade et al. 1981. Influence of prepubertal consumption of zearalenon on sexual development of boars. *J. Anim. Sci.*, 53, 1559-1556.
87. Bezuidenhout, S.C., W.C.A. Gelderblom, C.P. Gorst – Allman, R.M. Horak, W.F.O. Marasas, G.Spiteller, & R.Vleggaar, 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotixins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1988, 743 – 745.
88. Bird, C.B., B. Malone, L.G. Rice, P.F. Ross, R. Eppley, M.M. Abouzied, 2002. Determination of total fumonisins in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. *JAOAC Int.*; Mar-Apr.; 85(2):404:10.
89. Blaney, B. J., R. C. Bloomfield, C.J. Moor. Zearalenone intoxication in pigs. 1984. *Austr. Vet. J.*, 61, 24- 27.
90. Blaney, B. J., R L. Dodman. 1988. Production of the mycotoxins zearalenone, 4-deoxynivalenol and nivalenol by th isolates of *Fusarium graminearum*, *Austr. J. Agric. Res.* 39, 21-29.
91. Blout, W.P. 1961. Turkey “X” disease. *Turkeys* 9:52, 55-58, 61-77.
92. Bondy, G.S. and J.J. Pestka. 2000. Immunomodulation by fungal toxins. *J of Toxicology and Environmental Health*, part B, 3:109-143.

93. Borutova R, Faix S, Placha I, Gresakova L, Cobanova K, Leng L. 2008. Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers, *Arch. Anim. Nutr.* Aug; 62 (4): 303-12.
94. Bouhet, S., E. Hourcade, N. Loiseau, A. Fikry, S. Martinez, M. Roselli, P. Galtier, E. Mengheri, I. P. Oswald, 2004. The Mycotoxin Fumonisin B₁ Alters the Proliferation and the Barrier Function of Porcine Intestinal Epithelial Cells. *Toxicological Sciences* 77, 165-171
95. Bouhet, S., I.P. Oswald. 2005. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* Oct 18; 108 (1-2):199-209.
96. Brake, J., P.B. Hamilton, R.S. Kittrell. 2000. Effects of the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on feed consumption, body weight, and oral lesions of broiler breeders. *Poult Sci.* Jun; 79(6):856-63.
97. Bristol, F. M., S. Djuricovic, 1981. Hyperestrogenism in female swine as the result of feeding mouldy corn. *Can. Vet. J.*, 12, 132-135.
98. Broomhead, J.N., D.R. Ledoux, A.J. Bermudez, G.E. Rottinghaus, 2002,a. Chronic effects of fumonisin B₁ in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. *Poult Sci.* Jan; 81 (1) : 56 – 61.
99. Broomhead, J.N., D.R. Ledoux, A.J. Bermudez, G.E. Rottinghaus, 2002,b. Chronic effects of moniliformin in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. *Avian Dis.* Oct-Dec; 46 (4) : 901 – 8.
100. Bucci, T., D. K. Hansen and J. B. LaBorde. 1996. Leucoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. *Nat. Toxins* 4:51-52.
101. Cabassi, E., F. Miduri, A.M. Cantoni, 2005. Intoxication with fumonisin B₁ (FB₁) in piglets and supplementation with granulated activated carbon: cellular-mediated immunoresponse. *Vet Res Commun.*, Aug; 29 Suppl 2:225-7.
102. Campbell HM, Armstrong JF. 2007. Determination of zearalenone in cereal grains, animal feed, and feed ingredients using immunoaffinity column interlaboratory study, *J. AOAC Int.*, Nov-Dec; 90(6) : 1610-22.
103. Cantley, T.C., D.A. Redmer, G.D. Osweiler. B.N. Day. 1982. Effect of zearalenone mycotoxin on luteal function in gilts. *J. Anim. Sci.*, 55, Suppl. 1, 104-106.
104. CAST (Council for agricultural science and technology). 2003. In: Mycotoxins in plant animal and human systems. Task force report № 139. Ames, IA.
105. Carvet, S., S. Lecoeur, 2006. Fusariotoxin transfer in animal. *Food Chem Toxicol.*, Mar; 44(3):444-453.
106. Chang, K., H.J. Kurtz, C. J. Mirocha. 1979. Effects of mycotoxin zearalenone on swine reproduction. *Am. J. Vet. Res.*, 40, , 1260-1267.
107. Charpin – Kadouch, C., G. Maurel, R. Felipe, et al. 2006. Mycotoxin identification in moldy dwellings. *J. Appl. Toxicol.* 26(6):475–9.
108. Chatterjee D., S. Mukherjee and A. Dey. 1995. Nuclear disintegration in chicken peritoneal macrophages exposed to fumonisin B₁ from Indian maize. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20, 3, 184-185.
109. Chen, J.H., Y.L. Chu, J.L. Cao, Z.T. Yang, X. Guo, Z.L. Wang. 2006. T-2 toxin induces apoptosis, and selenium partly blocks, T-2 toxin induced apoptosis in chondrocytes through modulation of the Bax/Bcl-2 ratio. *Food Chem. Toxicol.*, 44(4):567-573.
110. Chen, Jing-hong, Jung-ling Cao, Yong-lie Chu, Zhi-lun Wang, Zhan-tian Yang, Hong-lin Wang. 2008. T-2 toxin-induced apoptosis involving Fas, p53, Bcl-xL,

- Bcl-xL-2, Bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes. *J. Zhejiang Univ. Sci B*, 9 (6):455-463.
111. Cheng, Y.H., S.T. Ding, M.H. Chang. 2006. Effect of fumonisins on macrophage immune functions and gene expression of cytokines in broilers. *Arch Anim Nutr.* Aug; 60 (4): 267-76.
 112. Choudhury SR, Smith TK, Boermans HJ, Woodward B. 2005. Effects of feed borne *Fusarium* mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. *Poult.Sci.*, Dec;84(12):1841-50.
 113. Christensen, C.M., N.H. Kaufmann. 1969. Grain storage – the role of fungal in quality loss. Univ. of Minnesota Press, Minneapolis, 153.
 114. Christensen, C.M., C.J. Mirocha, R.A. Meronuck. 1988. Molds and mycotoxins in feeds. *Minn.Ext.Serv.Bull.AG-FO-3538*. Univ. MN, St Paul.
 115. Chu, F.S. 1997. Trichothecene mycotoxicoses. *Encyclopedia Hum.Biol.* 8:511-522.
 116. Chu, F.S. 1998. Mycotoxins – occurrence and toxic effect, p.858-869. In M.Sadler, J.J. Strain and B. Caballero (ed.) *Encyclopedia of human nutrition*. Academic Press, New York, N.Y.
 117. Codner, R.C., K. Sargeant, R. Yeo. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnol.Bioeng.* 5:185-192.
 118. Connolly, A., D.O'Sullivan. 2005. Mycotoxin seminar series – why now? Implication for Europe and the European Union. Alltech. Proceedings of the European mycotoxin seminar series “Evaluating the impact of mycotoxins in Europe”, 22nd February, 2005, Sofia, Bulgaria.141-169.
 119. Constable, P.D., G.W. Smith, G.E. Rottinghaus, M.E. Tumbleson, W.M. Haschek. 2003. Fumonisin-induced blockade of ceramide synthase in sphingolipid biosynthetic pathway alters aortic input impedance spectrum of pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: 2034-2044.
 120. Coppock, R.W., M.S. Mostrom, C.G. Sparling, B. Jacobsen, S.C. Ross. 1990. Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Vet. Hum. Toxicol.* 32:246-248.
 121. Dacasto, M, P. Rolando, C. Nachtmann, L. Ceppa, C. Nebbia. 1995. Zearalenone mycotoxicosis in piglets suckling sows fed contaminated grain, *Vet. Hum. Toxicol.* Aug; 37 (4): 359-61.
 122. Danicke S., H. Valenta., F. Klobasa, S. Doll, M. Ganter, G. Flachowsky. 2008. Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics. *Arch. Anim. Nutr.*, 2004 Feb; 58(1): 1-17.
 123. Danicke, S, A. Beineke, T. Goyarts, H. Valenta, M. Beyer, H.U. Humpf. 2004. Effects of a *Fusarium* toxin-contaminated triticale, either untreated or treated with sodium metabisulphite (Na₂S₂O₅, SBS), on weaned piglets with a special focus on liver function as determined by the ¹³C- methacetin breath test, *Arch. Anim. Nutr.* Aug; 62 (4) :263-86.
 124. Danicke, S., S. Matthes, I. Halle, K.H. Uerberschar, S. Doll, H. Valenta. 2003. Effects of graded levels of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and of a detoxifying agent in broiler diets on performance, nutrient digestibility and blood chemical parameters, *Br. Poult. Sci*, Mar; 44(11): 113-26.
 125. Danicke, S., K.H. Ueberschar, I. Halle, H. Valenta, G. Flachowsky. 2001. Excretion kinetics and metabolism of zearalenone in broilers in dependence on a detoxifying agent, *Arch. Tierernahr.*; 55(44):229-313.

126. Danicke, S., K.P. Brüssow, H. Valenta, K.H. Ueberschar, U. Tiemann, M. Schollenberger. 2005. On the effect of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone, *Mol. Nutr. Food Res*, Oct; 49 (10) :932-43.
127. Danicke, S., K.P. Brüssow, T. Goyarts, H. Valenta, K.H. Ueberschar, U. Tiemann. 2007. On the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation. *Food Chem Toxicol*. Sep; 45(9):1565-74.
128. Deshmukh S., R. K. Asrani, D. R. Ledoux, N. Jindal, A. J Bermudez., G. E. Rottinghaus, M. Sharma, S. P. Sing. 2005. Individual and combined effects of *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, and *Salmonella gallinarum* infection on liver of Japanese quail. *Avian Dis.*, Dec, 49, 4, 592-600.
129. Devegowda, G., M.V.L.N. Raju, H.V.L.N. Swamy. 1998. Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs* 70: December 7, 12-15.
130. Devries, J., M.W. Trucksess, L.S. Jackson. 2002. *Mycotoxins and Food safety*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.
131. Diaz GJ, Calabrese E, Blain R. 2008. Aflatoxicosis in chickens (*Gallus, gallus*): an example of hormesis?, *Poult. Sci*, Apr;87(4) : 727-32.
132. Dilkin, P., P. Zorzete, C.A. Mallmann, J.D. Gomes, C.E. Utiyama, L.L. Oetting, B. Correa. 2003. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. *Food Chem Toxicol*. 41 (10):1345-53.
133. Dimitrov, M., M. Nicolcheva. 1983. Species appurtenance of fungal of genus *Fusarium* isolated from wheat, maize and been seed, *Plant Science*, 20, 120-125.
134. D'Mello, J.P.F., C.M. Placinta, A.M.C. Macdonald. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Sci Technol*, 80, 183-205.
135. D'Mello, J.P.F. 2000. Antinutritional factors and mycotoxins. In J.P.F. D'Mello, ed. *Farm animal metabolism and nutrition*. Wallingford, UK, CAB International, p. 383-403.
136. D'Mello, J.P.F. 2001. Mycotoxins in plant products. In J.P.F. D'Mello, ed. *Food safety*. Wallingford, UK, CAB International (in press)
137. Dobson, H., R.F.Smith.1955. Stress and reproduction in farm animals. *J. Reprod. Fert.,Suppl.*, 49, 137-146.
138. Dombrink-Kurtzman M. A., T. Javed, G. A. Bennett, J. L. Richard, L. M. Cote and W. B. Buck. 1993. Lymphocyte cytotoxicity and erythrocytic abnormalities induced in broiler chicks by fumonisins B₁ and B₂ and moniliformin from *Fusarium proliferatum*. *Mycopathologia*, Oct; 124, 1, 47-57.
139. Driehuis, F, M.C. Spanjer, J.M. Scholten, M.C. te Giffel. 2008. Occurance of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes, *J. Dairy Sci.*, Nov;91(11):4261-71.
140. Duarte-Vogel S, Villamil-Jimenez LC. 2006. Mycotoxins in public health, *Rev. Salud Publica (Bogota)*, May;8 Suppl 1:129-35.
141. Edwards S, T.C. Cantley, G.E. Rottinghaus, G.D. Osweiler, B.N. Day. 1987. The effect of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts, *Theriogenology*, Jul;28(1) : 43-9.
142. Edwards, S., T.C. Cantley, B.N. Day. 1987. The effects of zearalenone on reproduction in swine II. *Theriogenology* 28, 51-58.

143. EHC, 2000. Environmental Health Criteria 219: fumonisin B₁, International Programme on Chemical Safety (IPCS; UNEP, ILO and WHO). Eds. W.H.O. Marasas, J.D. Miller, Riley, R.T. and A. Visconti. WHO, Geneva, 150 pp.
144. Elaroussi, M.A., F.R. Mohamed, E.M. El Barkouky, A.M. Atta, A.M. Abdou, M.H. Hatab. 2006. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathol.* Aug; 35(4):263-9.
145. Eskola, M., P. Parikka, A. Rizzo. 2001. Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and fusarium infection in Finnish cereal samples in 1998. *Food Addit. Contam.* 18 (8), 707-718.
146. Espada Y, R. Ruiz de Gopegui, C. Cuadradass, F.J. Cabanes. 1994. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications *Avian Dis.* Jul-Sep; 38 (3): 454-60.
147. Ergun, E, L. Ergun, D. Essiz. Light and electron microscopic studies in liver histology in chicks fed aflatoxin, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2006 Oct; 113 (10) : 363-8.
148. Etienne, M., M. Jemmali. 1982. Effects of zearalenone (F-2) on estrus activity and reproduction in gilts. *J. Anim.Sci.* 55, 1-10.
149. Etzel, R. A. 2002. Mycotoxins. *JAMA*, 287 (4):425
150. Ewald, C., 1985. Zur Bestandsdiagnostik im Schweine-problembetrieb. *Der Practische Tierarttl.* 5, 382-390.
151. FAO. 2001. Manual on the Application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control.
152. Fitzpatrick, D. W., C. A. Picken., L. C. Murphy. 1989. Measurment of the relative binding affinity of zearalenone, 6-zearalenone and 8-zearalenone for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats, and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comp. Biochem Physiol.*, 94, , 691-694.
153. Fodor, J., K. Meyer, M. Riedlberger, J. Bauer, P. Horn, F. Kovacs, M. Kovacs, 2006. Distribution and elimination of fumonisin analogues in weaned piglets after oral administration of *Fusarium verticillioides* fungal culture. *Food Addit Contam.* May; 23 (5):492-501.
154. Friend, D. W., H. T. Trenholm. 1988. Mycotoxins in pig nutrition. *Pig news and information*, 9, , 395-401.
155. Friend, D. W., H. T. Trenholm, B. K. Thompson. 1990. The reproductive efficiency of gilts fed very low levels of zearalenone. *Can. J. Anim. Sci.* 70, 635-645.
156. Fung, F. 1998. *Stachybotrys*, a mycotoxin-producing fungus of increasing toxicologic importance. *J. of Clinical Toxicology* 36 (1-2):79-86.
157. Gajecki, M. 2002. Zearalenone-undesirable substances in feed. *Pol. J Vet Sci.* 5(2):117-22.
158. Gelderblom, W. C. A., K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar, and N. P. J. Kriek. 1988. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied Environmental Microbiology.* 54:1806-1811.
159. Glavits, R., G.Salyi. 1998. Mycotoxicoses in poultry. *Poultry international.* Vol. 37, (12), 60-65.
160. Global perspective of mycotoxins. 1977. In Joint FAO/WHO/UNEP. Conference of mycotoxins. Nairobi, Kenya. 19-27 Sept. 35.
161. Goldblatt, L. (ed.). 1969. Aflatoxin, scientific background, control, and implications. Academic Press, New York.
162. Gonzalez de Aguilar, J.L., J.W. Gordon, F. Rene. 2000. Alteration of the Bcl-x/Bax ratio in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: evidence for the implication of the p53 signaling pathway. *Neurobiol. Dis.*, 7(4):406-415.

163. Gopee N. V. and R. P. Sharma. 2004. The mycotoxin fumonisin B1 transiently activates nuclear factor- κ B, tumor necrosis factor α and caspase 3 via protein kinase C α -dependent pathway in porcine renal epithelial cells. *Cell Biol Toxicol.* Jul; 20, 4, 197-212.
164. Grabarkiewicz-Szczesna, J., M. Kostecki, P. Goliński, I. Kiecana. 2001. Fusariotoxins in kernels of winter wheat cultivars field samples collected during 1993 in Poland. *Nahrung.* 45(1):28-30.
165. Grosjean, F. and B. Barrier-Guillot. 2004. Mycotoxins in feedstuffs produced or imported in Europe for animal feeds. *International Society for Animal Hygiene.* Saint-Malo. 223-224.
166. Gumprecht, L.A., V.R. Beasley, R.M. Weigel, H.M. Parker, M.E. Tumbleson, C.W. Bacon, F.I. Meredith and W.M. Haschek, 1998. Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. *Toxicology-Pathology*, 26, 777 – 788.
167. Haliburton, J.C., R.F. Vesonder, T.F. Lock, W.B. Buck. 1979. Equine leucoencephalomalacia (ELEM): a study of *Fusarium moniliforme* as an etiologic agent.
168. Haschek, W.M., L. A. Gumprecht, G. Smith, M. E. Tumbleson, P. D. Constable, 2001. Fumonisin Toxicosis in Swine: An Overview of Porcine Pulmonary Edema and Current Perspectives. *Environmental Health Perspectives.* Vol. 109. Supl. 2. May, 251-257.
169. Harrach, B., Á. Bata, E. Bajmocy and Maria Benko. 1983. Isolation of Satratoxins from the Bedding Straw of a Sheep Flock with Fatal Stachybotryotoxicosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5):1419-1422.
170. Harrison, L. R., B. M. Colvin, J. T. Greene, L. E. Newman, and J. R. Cole, Jr. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2:217-221.
171. Harvey, R.B., L.F. Kubena, M.H. Elissalde, G.E. Rottinghaus, D.E. Corrier. 1994. Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine, *Am. J. Vet. Res.*, Dec; 55(12) : 1757-61.
172. Hedayati, M.T., A.C. Pasqualotto, P.A. Warn, P. Bowyer, D.W. Denning. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer, *Microbiology*, Jun;153(Pt 6) : 1677-92.
173. Hicks, J.K., K. Shimizu, N.P. Keller. 2002. Genetics and biosynthesis of aflatoxins and sterigmatocystin, p. 55-69. In F.Kempken (ed.), *the mycota*, vol. XI. Agricultural applications. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
174. Hinkley, S.F., B.B. Jarvis. 2001. Chromatographic method for Stachybotrys toxins, 173-194. In M.W. Trucksess and A.E.Pohland (ed), *Mycotoxin protocols.* Humana Press, Totowa, N.J.
175. Hussein, H.S., J.M.Brasel. 2001. Toxicity, metabolism and mycotoxins on humans and animals., *Toxicology*, 167:101-134.
176. Ibrahim, I.K., A.M. Shareef, K.M. Al-Joubory. 2000. Ameliorative effects of sodium bentonite on phagocytosis and Newcastle disease antibody formation in broiler chickens during aflatoxicosis. *Res Vet Sci.* Oct; 69 (2):119-22.
177. Ichinoe, M., H. Kurata. 1983 – In: *Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects*, Elsevier, 73-82.
178. ISO 7954:2002 – Доказване на дрожди и плесени.
179. Jansen, E. , E. R. De Sombre. 1973. Estrogen-receptor interaction. *Scienca*, 18, , 126-134.
180. Jarvis, B., 1971. Factors affecting the production of mycotoxins. *J. Appl. Bact.*, 34, 1, 199-213.

181. Jarvis, B. B., and E. P. Mazzola. 1982. Macrolytic and other novel trichothecens: their structure, synthesis, and biological significance. *Acc. Chem. Res.* 15:388–395.
182. Javed T, R. M. Bunte, M. A. Dombrink- Kurtzman, J. L. Richard, G. A. Bennett, L. M. Cote, W. B. Buck. 2005. Comparative pathologic changes in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or purified fumonisin B1 and moniliformin. *Mycopathologia*, Jun, 159, 4, 553-564.
183. Jelinek, C.F. 1987. Distribution of mycotoxin – an analysis of worldwide commodities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programme. Joint FAO/WHO/UNEP Second International Conference on mycotoxins. Bangkok, Thailand, September 28 to October 3.
184. Joffe, A.Z. 1986. *Fusarium species: their biology and toxicology*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
185. Johnson V. J., R. P. Sharma. 2001. Gender - dependent immunosuppression following subacute exposure to fumonisin B1 . *Int Immunopharmacol*, Oct, 1, 11, 2023-2034.
186. Joung, L. G., G. Y. King. 1983. Prolonged feeding of low levels of zearalenone to young boars. *J. Anim. Sci.*, 57, 314.
187. Kanchev, L., H. Dobson, B. Stankov. 1984. Early pituitary LH response to injection to GnRH in ewes. *Theriogenology*, 21, 407-417.
188. Katzenellenbogen, B. S., J. A. Katzenellenbogen, D. Mordecai. 1979. Zearalenones: characterisation of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β -resorcylic acid lactones. *Endocrinology*, 105, 33-40.
189. Keck B. B. and A. B. Bodine. 2006. The effects of fumonisin B1 on viability and mitogenic response of avian immune cells. *Poult Sci.*, Jun, 85, 6, 1020-1024.
190. Kinser, S., Q. Jia, M. Li, A. Laughter, P. Cornwell, J.C. Corton, J. Pestka. 2004. Gene expression profiling in spleens of deoxinivalenol-exposed mice: immediate early genes as primary targets. *Toxicol. Environ Health A*. Sep. 24; 67(18):1423-41.
191. Kolf-Clauw M, Ayouni F, Tardieu D, Guerre P. 2008. Variations in zearalenone activation in avian food species. *Food Chem. Toxicol*, May;46(5):1467-73.
192. Krogh, P., E. Hasselager, P. Friis. 1970. Studies on fungal compounds from *Penicillium viridicatum* Westling, Citrinin and oxalic acid, *Acta path. microbiol. Scand. Sect. B*, 78. 401-413.
193. Krogh, P., B. Hald, P. Englund, L. Rutqvist, O. Swahn. 1974. Contamination of Swedish cereals with ochratoxin A, *Acta path. Microb. scand., Sect. B*, 82, 301-302.
194. Krogh, P., N.H. Axelsen, F. Elling et al. 1974. Experimental porcine nephropathy: Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta path. Microb. scand., Sect. A*, 246, 1-21.
195. Krogh, P., 1978. Micotoxin okozta nefropatia – Magyar allatorv. *Lapja*, 34, 12, 831-832.
196. Krysinska-Traczyk E, Perkowski J, Dutkiewicz J. Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2007; 14(1):159-67.
197. Kuhn, D. M. and M. A. Ghannoum. 2003. Indoor Mold, Toxigenic Fungi, and *Stachybotrys chartarum*: Infectious Disease Perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 144–172.
198. Kurtz, H.J., K. Chang, C.J. Mirocha. 1980. Studies on the effect of zearalenone /F-2/ mycotoxin on swine reproduction. In: *Procc. IPVS*, Copenhagen, 291, 1980.

199. Labuda, R., D. Tancinová. 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13(2):193– 200.
200. Larsen, S., 1928. On chronic degeneration of the kidneys (nephrosis) in pigs caused by moulty rye. *Manedsskr.Dyrl*, 40, 259-284, 289-300.
201. Leal, M., A. Shimada, F. Ruiz, E. Gonzalez de Mejia. 1999. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. *Toxicol.Lett.*, 109 (1-2):1-10.
202. Ledoux D. R., T. P. Brown, T. S. Weibking, G. E. Rottinghaus. 1992. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J Vet Diagn Invest.*, Jul, 4, 3, 330-333.
203. Ledoux, D. R., J.N. Broomhead, A.J. Bermudez, G. E. Rottinghaus, 2003. Individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B₁ and moniliformin in broiler chicks. *Avian Dis.* Oct-Dec; **47** (4):1368-75.
204. Leeson, S., G. Diaz, J.D. Summers. 1995. *Poultry metabolic disorders and mycotoxins*. University Books. Guelph, Canada.
205. Li, Si-yuan, Jun-ling Cao, Zhong-li Shi, Jing-hong Chen, Zeng-tie Zhang, Clare E. Hughes, Bruce Caterson. 2008. Promotion of the articular cartilage proteoglycan degradation by T-2 toxin and selenium protective effect, *J. Zhejiang Univ. Sci B*, 9 (1):22-33.
206. Logrieco, A., G. Mule, A. Moretti, A&Bottalico, A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant pathology*, 108, 597-609.
207. Long, G.G., M. Diekman, J.F. Tuite, G.M. Shannon, R.F. Vesonder. 1982. Effect of *Fusarium roseum* corn culture containing zearalenone on early pregnancy in swine, *Am. J. Vet. Res*, Sep; 43(9) : 1599-603.
208. Long, G. G., M. A Dickman, J. F. Tuite, G. M Shannon, R.F. Vesonder. 1983. Effect of *Fusarium roseum* (*Giberella zea*) on pregnancy and the estrus cycle in gilts fed molded corn on days, 7-17 postestrous. *Vet. Res. Commun*, 6, , 199-204.
209. Long, G.G., M. Diekman. 1984. Effect of purified zearalenone on early gestation in gilts. *J. Anim. Sci.* 59, 1662-1669.
210. Weckbach, L., E. Marth, 1977. Aflatoxin production in a competitive environment. *Mycopathologia*, 62, 39-45.
211. Magan. S& Olsen, M., 2004, *Mycotoxins in food. Detection and control*. Cambridge: CRC Press.
212. Male D. 1986. *Immunology. An illustrated outline*, , MOSBY/Gower, 1-116.
213. Malekinejad, H, R. Maas-Bakker, J. Fink-Gremmels. 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone, *Vet. J*, Jul; 172 (1):96-102.
214. Marasas, W. F. O., J. D. Miller, R. T. Riley, A. Visconti. 2001. Fumonisin-occurrence, toxicology, metabolism and risk assessment, p, 332-359.
215. Marasas, W.F.O. 2001. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ. Perspect.* 109 Suppl 2:239-243.
216. Marasas, W. F.O., R. T. Riley, K. A. Hendericks, V. L. Stevens, T. W. Sadler, J.G.- van Waes, S. A. Missmer, J.Cabrera, O. Torres, W. C. A. Gelderblom, J. Allegood, C. Martinez, J. Maddox, J. D. Miller, L. Starr, M. C. Sullards, A. V. Roman, K. A. Voss, E. Wang, A. H. Jr. Merrill, 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize.*J.Nutr.* 134: 711-716.
217. Matossian, M.K. 1982. Ergot and the Salem witchcraft affair. *Am.Sci.* 70:355-357.
218. Matsumoto, H., T. Ito, Y. Ueno. 1978. *Japan J. Exp. Med*, vol. 48, p.393-399.

219. McLauhlin, C.S.M.H. Vaughan, I.M.Campbell, C.M.Wei, M.E. Stafford, B.S.Hansen. 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes, p. 261-284. In J.V.Rodricks, C.W. Hesseltine, M.A. Mehlman (ed.), *Mycotoxins in human and animal health*. Pathox Publications, Park Forest South, III.
220. Meireless, M.C., B. Correa, O. Fischman, W. Gambale, C.R. Paula, N.O. Chacon-Reche, C.R. Pozzi. 1994. Mycoflora of the toxic feeds associated with leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. *Mycopathologia*. Sep; 127(3): 183-8.
221. Meissonnier, G.M., P. Pinton, J. Laffitte, A.M. Cossalter, Y.Y. Gong, C.P. Wild, G. Bertin, P. Galtier, I.P. Oswald. 2008. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cellmediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol.Appl. Pharmacol.*, Sep 1;231(2): 142-9.
222. Meissonnier, G.M., J. Laffitte, I. Raymond, E. Benoit, A.M. Cossalter, P. Pinton, G. Bertin, I.P. Oswald, P. Galtier. 2008. Subclinical doses of T-2 toxin impair acquired immune response and liver cytochrome P450 in pigs.
223. Merrill, A.H. Jr., E.M. Schmelz, D.L. Dillehay, S. Spiegel, J.A. Shayman, J.J. Schroeder, R.T. Riley, K.A. Voss and E. Wang., 1997. Sphingolipids – The enigmatic lipid class: Biochemistry, Physiology and Pathophysiology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142, 208-225.
224. Merrill, A. H. Jr, M. C. Sullards, E. Wang, K. A. Voss, and R. T. Riley. 2001. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* 109(Suppl. 2):283-289.
225. Meyer, K., E. Usleber, E. Märklbauer, J. Bauer. 2000. Occurence of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol in bile of breeding sows in relation to reproductive performance. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* Oct; 113(10):374-9.
226. Meyer, K., K. Mohr, J. Bauer, P. Horn, M. Kovács. 2003. Residue formation of fumonisin B₁ in porcine tissues. *Food Addit Contam.* Jul;20(7):639-47.
227. Miller, J. D., T. G. Rand, B. B. Jarbis. 2003. *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? *Medical Mycology*, 41 (4):271–291.
228. Miller, J.D., 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environ Health Perspectives*, vol. 109, suppl 2, 321-324.
229. Minervini, F., F. Fornelli, G. Lucivero, C. Romano, A. Visconti. 2005. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines. *Toxicology*, 210 (1):81-91.
230. Mirocha, C. J., C. M. Christensen. 1974. Fungus metabolites toxic to animals. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 12, 303-330.
231. Mirocha, C. J., C. M. Christensen. 1974. Oestrogenic mycotoxin, synthesized by *Fysarium*. In: *Mycotoxins*, IFH.
232. Mirocha, C. J., S.V. Pathre, C. M. Christensen. 1980. In : *advances in cereal science and technology*, Vol. 3, Amer.Assoc. Cereal.Chem., Inc. St.Poul, Minnessota, 159-225.
233. Missmer, S., K. A. Hendricks, L. Suarez, R. D. Larsen, and I. J. Rothman. 2000. Fumonisin and neural tube defects. *Epidemiology* 11:183-184.
234. Missmer, S.A., L. Suarez, M. Felkner, E. Wang, A.H. Merill Jr, K.J. Rothman, K.A. Hendricks. 2006. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ Health Perspectives*, vol. 114, № 2, Feb, 237-241.
235. Moreno, E.M., 1988. Manual para la identification de Hongos en granos y sus derivados.
236. Murphy, P.A., S. Hendrich, C. Landgren, C. Bryant. 2006. Food mycotoxins: An Update, *Journal of food sciences*, Vol.71, №5, 51-65

237. Nelson, P. E., Desjardins, A.E. & Plattner, R.D. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31, 233-252.
238. Nenov, P., M. Dimitrov. Mycological investigation of Bulgarian wheat from the 1987, 1988 and 1989 crop years. *The man and his environment* 15, 1992, 1-6.
239. Nikiema, P.N., L. Worrillow, A.S. Traore, C.P. Wild, P.C. Turner, 2004. Fumonisin contamination of maize in Burkina Faso, West Africa. *Food Addit Contam. Sep*; 21 (9) : 865 – 70.
240. NTP, 1999. NTP technical Report Toxicology and Carcinogenesis studies of fumonisin B₁ (CAS NO. 116355-83-0) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (Feed studies). NTP TR 496, NIH Publication No.99-3955, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health. Pg 1-46.
241. Oguz, H., F. Kurtoglu, V. Kurtoglu, Y.O. Birdane. 2002. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Res Vet Sci. Aug*; 73(1):101-3.
242. Oguz, H., V. Kurtoglu. 2000. Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *Br Poult Sci. Sep*; 41(4):512-7.
243. Ortatli, M., H. Oguz. 2001. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. *Res. Vet Sci. Aug*; 71(1):59-66.
244. Oswald, I.P., C. Desautels, J. Laffite, S. Fournout, S. Y. Peres, M. Odin, P. L. Bars, J. L. Bars, J. M. Fairbrother, 2003. Mycotoxin Fumonisin B₁ Increases Intestinal Colonization by Pathogenic *Escherichia coli* in Pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 2003, Vol. 69, № 10, p. 5870-5874
245. Oswald, I.P., D.E. Marin, S. Bouhet, P. Pinton, I. Taranu, F. Accesi. 2005. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Addit Contam. Apr*; 22(4):354-360.
246. Osweiler, G.D., 1996. *Toxicology*, Williams and Wilkins, USA, 231 – 237.
247. Osweiler, G.D., 2001. Mycotoxins. *Vet Clin North Am Equine Pract. Dec*; 17(3):547-66.
248. Otim, M.O., G. Mukiibi-Muka, H. Christensen, M. Bisgaard. 2005. Aflatoxicosis, infectious bursal and immune response to Newcastle disease vaccination in rural chickens, *Avian. Pathol*, Aug; 34(4) : 319-23.
249. Pandey, I., S.S. Chauhan. 2007. Studies on production performance and toxin residues in tissues and eggs of layer chickens fed on diets with various concentrations of aflatoxin AFB₁, *Br. Poult. Sci*, Dec; 48(6) : 713-23.
250. Parent-Massin D. 2004. Haematotoxicity of trichotecenes, *Toxicol. Lett*, Oct 10; 153(1):75-81.
251. Park, D.L., R. Lopez-Garcia, S. Trujillo-Preciado, R.L. Price. 1996. Reduction of risks associated with fumonisin contamination in corn. *Adv Exp Med Biol*. 392:335-4.
252. Pasteiner, S. 1998. Mycotoxin in Animal Husbandry. *Biomim Ges. Tierernahrung Int*, , 55-56.
253. Pathre, S, V., C.J. Mirocha. 1980. Mycotoxins as estrogens. In: *Estrogens in the environment*, ed. J. A. McHachlan, Elsevier, Amsterdam, , 265-278.
254. Patterson, D.S.P., P.H. Anderson. 1982. Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. *Vet. Rec.* 110-60-61.
255. Pestka, J.J., A.T. Smolinski. 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ Health B Crit Rev*. Jan-Feb; 8 (1):39-69.

256. Petrincic, Z., S. Pepeljnjak, S. Kovacic, A. Krznaric, 2004. Fumonisin B₁ causes multiple lesions in common carp (*Cyprinus carpio*). *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* Sep; 111 (9):358-63.
257. Perkowski, J., J., Chelkowski and W. Wakilinski. 1990. Mycotoxins in cereal grains. Part 13. deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol in wheat kernels and chaff with head fusariosis symptoms. *Nahrung*, 34, , 325-328.
258. Peshin, S.S., S.B. Lall, S.K.Gupta. 2002. Potential food contaminants and associated health risks., *Acta Pharmacol Sin*; 23 (3): 193-202.
259. Pestka, J.J., H.R.Zhou, Y. Moon, Y.J. Chung, 2004. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unravelling a paradox. *Toxicol Lett* 153:61-73.
260. Pestka JJ, Smolinski AT. 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ Health B Crit. Rev.* Jan-Feb; 8(1): 39-69.
261. Pestka, JJ, I. Yike, DG. Dearborn, et al. 2008. *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building – related illness: new insights into a public health enigma. *Toxicol. Sci.* 104(1):4–26.0
262. Peraica, M., B. Radic, A. Lucic, and M. Pavlovic. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. W. H. O.* 77:754–766.
263. Phillips, T.D., S.L. Lemke, P.G. Grant. 2002. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Adv Exp Med Biol.*; 504:157-71.
264. Pinton P, Accensi F, Beauchamp E, Cossalter AM, Callu P, Grosjean F, Oswald IP. 2008. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicol. Lett.* Apr 1; 177(3):215-22.
265. Pitt JI. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull*, 2000;56(1):184-92.
266. Piva, A., G. Casadei, G. Pagliuca, E. Cabassi, F. Galvano, M. Solfrizzo, R.T. Riley, D.E. Diaz. 2005. Aug; 83 (8):1939-47.
267. Pozzi, C.R., B.Correa, W. Gambale, C.R. Paula, N.O. Chacon-Reche and M.C.A. Meirelles. 1995. Postharvest and stored corn in Brazil – mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. *Food additives and contaminants*, 12:313-319.
268. Prelusky, D.B., H.L. Trenholm, B.A. Rotter, J.D. Miller, M.E. Savard, J.M. Yeung and P.M. Scott. 1996. Biological fate of fumonisin B₁ in food-producing animals., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 392, 265-278.
269. Qureshi M. A. and W. M. Jr. Hagler. 1992. Effect of fumonisin-B₁ exposure on chicken macrophage functions in vitro. *Poult Sci*, Jan, 71, 1, 104-112.
270. Qureshi M. A. , J. D. Garlich, W. M. Jr. Hagler, D. Weinstock. 1995. *Fusarium proliferatum* culture material alters several production and immune performance parameters in White Leghorn chickens. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, Nov, 17, 4, 791-804.
271. Rauber RH, Dilkin P, Giacomini LZ, Araujo de Almeida CA, Mallmann CA. 2007. Performance of turkey poult fed different doses of aflatoxins in the diet, *Poult. Sci*, Aug; 86(8) :1620-4.
272. Rezar, V., T. Frankic, M. Narat, A. Levart, J. Salobir. 2007. Dose dependant effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler and chickens. *Poult Sci.* Jun;86(6): 1155-60.
273. Rheeder, J.P. et al. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82, 353-357.
274. Rheeder, J. P., W. F. Marasas, and H. F. Vismer. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2102-2105.

275. Roger, D.W., 1993. Moulds, mycotoxins and the problems they cause. In: *Biothehnology in feed industry, Procc. Of Alltechs 14-th Annual Symposium*, Nottingham Univ.Press.UK, 33-39.
276. Rosa, C.A., R. Miazzo, C. Magnoli, M. Salvano, S.M. Chiacchiera, S. Ferrero, M. Saenz, E.C. Carvalho, A. Dalcero. 2001. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poult Sci.* Feb; 80(2):139-44.
277. Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitxin). *J. Toxicol. Environ Health*, May;48(1):1-34.
278. Ruhr, L.P., G. D. Osweil, C. W. Fijley. 1983. Effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on reproductive potential in the boars. *Am.J. Vet. Res.*, 43, 483-485.
279. Ruth, A. Etzel. 2002. Mycotoxins. *The Journal of the American Medical Association*, vol.287, № 4; 425-427.
280. Samapundo, S., F. Devlieghere, B. De Meulenaer, J. Debevere, 2005. Effect of water activity and temperature on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *J Food Prot.* May;68(5):1054-9.
281. Samapundo, S., B. De Meulenaer, A. Atukwase, J. Debevere, F. Devlieghere, 2007. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B(1) production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. Part II: The effect of initial headspace oxygen concentration. *Int J Food Microbiol.* Feb 15;113(3):339-45.
282. Scott, P.M. 1989. The natural occurrence of trichothecenes, p.1-26. In V.H. Beasley (ed.) *Trichothecenes mycotoxicosis: pathophysiologic effects*, vol.I. CRC Press, Boca Raton, Fla.
283. Scudamore, K.A., J.Banks. 2003. The fate of mycotoxins during cereal proceeding. Meeting the mycotoxin menace, In: *Proceedings of the 2-nd Worlf mycotoxin forum*, Nordwijk, The Netherlands, February 2003, Wageningen Academic Publishers.
284. Scudamore, K.A., J. Banks, R.Guy. 2004. Food additives and contaminants, 21, 488-497.
285. Scudamore, K.A. 2005. Principles and application of mycotoxin analysis. (in press).
286. Seefelder W., H. U. Humpf, G. Schwerdt, R. Freudinger, M. Genkle. 2003. Introduction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, Oct. 15, 192, 2, 146-153.
287. Sewram, V., N. Mshicileli, G. S. Shephard, M. F. Marasas, 2003. Fumonisin mycotoxins in human hair. *Biomarkers.* Mar-Apr;8(2):110-8.
288. Sharma N., H. Suzuki, Q. He, R. P. Sharma. 2005. Tumor necrosis factor alpha-mediated activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase as a mechanism for fumonisin B(1) induced apoptosis in murine primary hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol*, 19, 6, 359-367.
289. Sharma N., Q. He, R. P. Sharma. 2006. Amelioration of fumonisin B1 hepatotoxicity in mice by depletion of T cells with anti-Thy-1.2. *Toxicology*, Jun 15, 223, 3, 191-201.
290. Shephard G.S., P.G. Thiel, S. Stockenstrom, E.W. Sydenham, 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J AOAC Int* May-Jun 79:671-87.

291. Shephard GS, Impact of mycotoxins on human health in developing countries. Food Addit Contam part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess. 2008 Feb; 25(2):146-51.
292. Shotwell, O.L., C.W. Hesseltine, R.D. Stubblefield, W.G. Sorenson. 1966. Production of aflatoxin on rice. Applied Microbiology, vol. 14, №3, 425-428.
293. Shotwell, O.L., C.W. Hesseltine, M.L. Goulden. 1969. Ochratoxin A: Occurrence as natural contaminant of a corn sample. Appl. Microbiol, 17, 765-766.
294. Shreeve, B.J., D.S. Patterson, A.E. Wratale. 1978. Effect of mouldy feed containing zearalenone on pregnant sows. Br.Vet.J., 134, 421-426.
295. Simsek, N, L. Ergun, E. Ergun, B. Alabay, A. Ozen. 2007. Ultrastructure of pancreatic alpha and beta cells in young quails (*Coturnix, coturnix japonica*) fed aflatoxin, Dtsch. Tierarztl. Wochenschr, Dec; 114(12) : 465-9.
296. Smith, J.E., Solomons, G.L. 1994. Mycotoxins in human nutrition and health. Directorate – General XII; Science, Research and Development. EUR 16048 EN. Pg 1 – 288.
297. Smith, G.W., P.D. Constable, R.M. Eppley, M.E. Tumbleson, L.A. Gumprecht, W.M. Haschek-Hock. 2000. Purified fumonisin B₁ decreases cardiovascular function but does not alter pulmonary capillary permeability in swine. Toxicol. Sci. 56 (1):240-9.
298. Sobolev, V.S., K.T. Eller. 1990. Deoxinivalenol (Vomitoxin) contamination of wheat harvested in 1986-1988. Vopr. Pitan., 1, 68-71.
299. Sokolovic, M, V. Garaj-Vrhovac, B. Simpraga 2008. T2-toxin: incidence and toxicity in poultry. Arch hig Rada Toksikol., mar;59(1): 43-52.
300. Solfrizzo, M., S.N. Chulze, C. Mallmann, A. Visconti, A. De Girolamo, F. Rojo, A. Torres, 2004. Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. Food Addit Contam. Nov; 21 (11) : 1090 – 5.
301. Soriano, J.M., L. Gonzalez, A.I. Catala, 2005. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B₁. Progress in Lipid Research 44: 345–356.
302. Statistical Information Center Of Health Ministry of China. 2005. Report on population survey of prevention and treatment of Kashin-Beck disease of China in 2005. Chin.J.Epidemiol., 24 (5): 589-591.
303. Stein, M., Pilzgifte, 1994: Die unsichtbare gefak TopAgar 3,.
304. Steyn, P.S. 1966. Chemical studies related to *A.ochraceus*. Wilh. Thesis, University of south Africa, Pretoria.
305. Steyn, P.S., C.W. Holzapfel. 1966. The isolation of the methyl and ethyl estars of ochratoxin A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. Wilh. J.S.Afr.Chem.Inst., 20, 186-189.
306. Stoev, S.D., M. Stefanov, S.Denev, B. Radic, A.M.Domijan, M. Peraica. 2004. Experimental mycotoxicosis in chickens induced by ochratoxin A and penicillic acid and intervention with natural plant extracts. Nov. Vet.Res Commun; 28(8):727-46.
307. Stolla, R., J. Bauer, B. Gadek. 1987. Spermatobeschaffenheit beim Eber nach Verfütterung des Mycotoxins Zearalenone. Zuchthyg., 165-172.
308. Surai, P., J. Dvorska. 2005. Interactions between mycotoxins, immunity and antioxidant systems. Proceedings of the european mycotoxin seminar series “Evaluating the impact of mycotoxins in Europe”, 22-nd February 2005, Sofia, Bulgaria. 50-77.
309. Sydenham, E. W., G. S. Shephard, P. G. Thiel, W. F. O. Marasas, and S. Stockenstrom. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. J. Agric. Food Chem. 39:2014-2018.

310. Taranu, I., D.E. Marin, S. Bouhet, F. Pascale, J.D. Bailly, J.D. Miller, P. Pinton, I.P. Oswald., 2005. Mycotoxin fumonisin B₁ alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. *Toxicol-Sci.* Apr; 84(2): 301-7
311. Tajik, H., S.M. Rohani, M. Moradi. 2007. Detection of aflatoxin B₁ in raw and commercial pasteurized milk in Urmia, Iran. *Pak J Biol. Sci.*, Nov 15;10 (22):4103-7.
312. Taylor, D.G. 1995. Pig diseases Ed. By the Burlington Press Ltd, Foxton, Cambridge, 4-th ed., 228-233.
313. Tessari E. N. C, C. A. F. Olivera, A. L. S. P. Cardoso, D. R. Ledoux, G. E Rottinghaus. 2006. Effects of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *Br Poult Sci*, Jun, 47, 357-364.
314. Tiemann, U., S. Danicke, 2007. In vivo and in vitro effects of the mycotoxin zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit Contam. Mar*; 24(3):306-14.
315. Tiemann U, Brussow KP, Kuchenmeister U, Jonas L, Pohland R, Reischauer A, Jager K, Danicke S. 2008. Changes in the spleen and liver of pregnant sows and full-term piglets after feeding diets naturally contaminated with DON and ZEA, *Vet. J.*, May;176(2):188-96.
316. Tiemann, U., K.P. Brussow, S. Danicke, J. Vanselow. 2008. Feeding of pregnant sows with mycotoxin-contaminated diets and their non-effect on foetal and maternal hepatic transcription of genes of the insulin-like growth factor system. *Food Addit Contam. Jul*.18:1-9.
317. Thieu NQ, Ogle B, Pettersson H. 2008. Screening of Aflatoxins and Zearalenone in feedstuffs and complete feeds for pigs in Southern Vietnam, *Trop. Anim. Health Prod.* Jan; 40(1):77-83.
318. Torniyos, G., M. Kovacs, M. Rusvai, P. Horn, J. Fodor, F. Kovacs. 2003. Effect of dietary fumonisin B₁ on certain immune parameters of weaned pigs. *Acta Vet Hung.* 51 (2): 171-9.
319. Toulah FH. 2007. Effect of aflatoxin on the coccidial infection in broilers, *J. Egypt Soc. Parasitol.*, Dec; 37(3) : 785-92.
320. Tran, S. T., D. Tardieu, A. Auvergne, J. D. Bailly, R. Babile, S. Durand, G. Benard, P. Guerre, 2006. Serum sphinganine and the sphinganine to sphingosine ratio as a biomarker of dietary fumonisins during chronic exposure in ducks. *Chem Biol Interact.* Jan 12; [Epub ahead of print]
321. Tsakmakidis, I.A., A.G. Lymberopoulos, T.A. Khalifa, C.M. Boscios, A. Saratsi, C. Alexopoulos. 2008. Evaluation of zearalenone and alpha-zearalenol toxicity on boar sperm DNA integrity, *J. Appl. Toxicol.* Jul; 28(5): 681-8.
322. Turner, N.W., S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review, *Anal. Chem. Acta*, Jan 26;632 (2) : 168-80.
323. Ueno, Y., 1983. In: *Trichothecenes – chemical, biological and toxicological aspects*, Amsterdam, Elsevier, p.125-146.
324. Ueno, Y., K. Umemori, E. Niimi, S. Tanuma, S. Nagata. 1995. Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. *Nat. Toxins*, 3 (3):129-137.
325. Uhlinger, C., 1991. Clinical and epidemiologic features of an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1, 198 (1), 126-128.
326. Van der Merwe, K.J., P.S. Steyn, L. Fourie, D.B. Scott, J.J. Theron. 1965. Ochratoxin A a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*, *Wilh. Nature*, 205, 1112-1113.

327. Van der Merwe, K.J., P.S. Steyn, L. Fourie. 1965. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus*, Wilh. Nature, 7083-7088.
328. Van Kessel, T.F.M., N. Hiang-Chek. 2001. Aflatoxin binders – how to get the best value for money. International Poultry Production. 12(4):33-35.
329. Vanyi, A. Fusariotoxikosok V. 1974. F-2 toxin. (zearalenon) rataza noivarn sertesek ivari tevekenyseger.Mag. All. Lapja, 29, , 723-740.
330. Vanyi, A., A. Szeky. Fisariotoxikosok 6. Theeffect of F-2 toxin (zearalenone) on the spermatogenesis of male swine. Magy Allator Lapja., 35,1980, 242-246.
331. Vanyi, A., A. Bata, R.Glavits and F.Kovacs. Perinatal oestrogen syndrome in swine. 1994. Acta Vet. Hungarica, 42: 433-446.
332. Vanyi, A., R.Glavits, T. Molner. 1995. Reproductive disorders due to F-2 and T-2 toxins in large-scale pig farms. Magyar Allatorvosok Lapja, 50: 424-430.
333. Vesper, S.J., D. G. Dearborn, O. Elidemir, and R. A. Haugland. 2000. Quantification of siderophore and hemolysin from *Stachybotrys chartarum* strains, including a strain isolated from the lung of a child with pulmonary hemorrhage and hemosiderosis. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2678–2681.
334. Vesper, S.J., D. G. Dearborn, I.Yike, et al. 1999. Hemolysis, toxicity, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Stachybotrys chartarum* strains. Appl. Environ. Microbiol. 65:3175–3188.
335. Vesper, S.J., M. L. Magnuson, D. G. Dearborn, et al. 2001. Initial characterization of the hemolysin stachylysin from *Stachybotrys chartarum*. Infect. Immun. 69:912–916.
336. Voss, K.A., R.T. Riley, W.P. Norred, C.W. Bacon, F.I. Meredith, P.C. Howard, R.D. Plattner, T.F.X. Collins, D.K. Hansen, J.K.Porter, 2001. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. Environ Health Perspectives, vol 109, suppl 2, 259-266.
337. Voss, K.A., R. Riley, C. Dunn, J. Corton Christopher, 2006. The role of tumor necrosis factor alpha and the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in modulating the effects of fumonisin in mouse liver. Toxicology. Feb 28; [Epub ahead of print].
338. Vousden, K.H. 2000. p53:death star. Cell, 103 (5):691-694.
339. Vrabcheva, T., K. Gessler, E. Usleber and E. Martlbauer. 1996. First survey on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Bulgarian wheat. Mycopathologia, 136, 47-52.
340. Wanda, M. H., J. C. Haliburton. 1986. *Fusarium moniliforme* and zearalenone toxicoses in domestic animals: a review. In: Diagnosis of mycotoxicoses, ed.J.L.Richard and J. R. Thurston, Nat. Anim. Dis. Center, Iowa, 213-235.
341. Wanda, M.H., J. C. Hamilton. 1986. *Fusarium moniliforme* and zearalenone toxicosis in domestic animals. A review: In Diagnosis of mycotoxicosis in domestic animals. Ed. by J. L. Richard and J. R. Thurston, Nat. Anim. Dis. Center, Iowa, USA, 2,
342. Wang, J. S., and J. D. Groopman. 1999. DNA damage by mycotoxins. Mutat. Res. 424:167–181.
343. Wang, E., W.P.Norred, C. W. Bacon, R. T. Riley, A. H. Jr. Merrill. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. J. Biol. Chem. Aug 5, , 266(22), 14486-14490.
344. Wang, E. et al. 1992. Alteration of serum sphingolipids upon exposure of ponies to feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. J. Nutr. 122, , 1706-1716.

345. Wang, E., R.T. Riley, F.I. Meredith, A.H.Jr Merrill, 1999. Fumonisin B₁ consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *Journal of Nutrition*.129, 214-220.
346. Wang, H. et al. 2000. The fumonisin B₁ content in corn from north China, a high-risk area of esophageal cancer. *Journal of Enviromental Pathology, Toxicology and Oncology*, , 19, 139-141.
347. Wang, S.J., X. Guo, H. Zuo, Y.G. Zhang, P. Xu, Z.G.Ping, Z.T.Zhang, D. Geng. 2006. Chondrocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and NOS in articular cartilage in patients with Kashin-Beck disease. *J. Rheumatol*. 33(3):615-619.
348. Weckbach, L., E. Marth. 1977. Aflatoxin production in a competitive environment. *Mycopathologia*, 62, 39-45.
349. Wilson, T. et al., 1990. Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J.Vet.Diagn. Invest.*, 2 (3), 213-216.
350. Withanage, G. S., H. Murata, T. Koyama, and I. Ishiwata. 2001. Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG₂ human cancer cell lines. *Vet. Hum. Toxicol*. 43:6-10.
351. Whitlow, L. W. 2005. Molds and mycotoxins in feedstuffs-Prevention and treatment. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*.
352. WHO. 1990. Selected mycotoxins: ochratoxins, trichotecenes, ergot. Report of an expert committee. *Environmental health criteria*, no 105. WHO, Geneva, Switzerland.
353. WHO. 2006. Mycotoxins in african foods: implications to food safety and health. *Food Safety Newsletter*.
354. Wong, S., R. C. Schwartz, and J. J. Pestka. 2001. Superinduction of TNF-alpha and IL-6 in macrophages by vomitoxin (deoxynivalenol) modulated by mRNA stabilization. *Toxicology*, 161:139-149.
355. Yike, I., T. Allan, W. G. Sorenson, and D. G. Dearborn. 1999. Highly sensitive protein translation assay for trichothecene toxicity in airborne particulates: comparison with cytotoxicity assays. *Appl. Environ. Microbiol*. 65:88-94.
356. Yin Yan-ni, Lei-yan Yan, Jin-hua Jiang, Zhong-hua Ma. 2008. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9 (10): 787-792.
357. Yu, M. C., M. Yuan, S. Govindarajan, and R. K. Ross. 2000. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Can. J. Gastroenterol*. 14:703-709.
358. Yu, J., G.A. Payne, W.C. Nierman, M. Machida, J.W. Bennett, B.C. Campell, J.F. Robens, D. Bhatnagar, R.A. Dean , T.E. Cleveland. 2008. *Aspergillus flavus* genomics as a tool for studying the mechanism of aflatoxin formation. *Food Addit Contam*. Aug 15:1-6.
359. Young, L. G., G. Y. King. 1986. Low concentrations of zearalenone in diets of boars for a prolonged period of time. *J.Anim. Sei.*,63, 1197-1200.
360. Zhang, H., H. Nagashima, T. Goto. 1997. Natural occurrence of mycotoxins in corn samples from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Mycotoxins*, 44, 29-35.