Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

# Četvrti simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 14 juni 1991

**Ožegović, Ladislav (urednik)**

**1996.**

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/handle/123456789/824

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

SPECIJALNA IZDANJA
VOL. CIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Vol. 17

# ČETVRTI SIMPOZIJUM O MIKOTOKSINIMA

(Sarajevo, 14 Juni 1991)

Redakcioni odbor
Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković

Glavni urednik
Ladislav Ožegović
Redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 1996

# SIMULTANA DETEKCIJA DON, DAS, T-2 TOKSINA I NJIHOVIH METABOLITA U KUKURUZU

ZVONKA KABAJ-TOMŠIČ, ANTON VENGUŠT, JANKO ŽUST, UROŠ PESTEVŠEK

*Institut za higieno in patologijo prehrane domačih živali, VTOZD za veterinarstvo, Ljubljana*

Apstrakt. Opisana je problematika kontaminacije stočne hrane mikotoksinima iz grupe trihotecena. Posebna pažnja je bila posvećena hemijskom određenju tih toksina. Poslije hidrolize, pomoću koje smo pretvorili diacetoksiscirpenol, T-2 toksin i njihove metabolite te metabolite deoksinivalenola u scirpentriol (STR), T-2 tetraol (TOL) i deoksinivalenol (DON), toksine smo odredili simultano plinskom kromatografijom EC detektorom. Kvalitativno utvrđivanje smo obavili masenom spektroskopijom.

## UVOD

Trihotecene proizvode gljivice iz roda Fusarium, Myrothecium, Stachybotris, Cephalosporium i Trichoderma. Najvažniji proizvođači tih toksina su *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae* i *Stachybotris atra*. Vrsta i količina toksina zavisi od supstrata, temperature, vlage i drugih činitelja. Velika količina trihotecena pronađena je samo u kulturama gljivica. Među toksinima izoliranim iz prirodnih supstrata, najvažniji su T-2 toksin, diacetoksiscirpenol (DAS), deoksinivalenol (DON) i nivalenol (NIV), koji mogu pojedinačno ili u kombinaciji s drugim toksinima prouzrokovati zdravstvene smetnje kod ljudi i životinja (2, 3, 4).

Trihoteceni su seskviterpeni (15 C atoma), čija osnova je trihotecensko jezgro 12,13-epoksitrihotec-9en. Delimo ih na 4 veće grupe: A, B, C i D. Razlikuju se po supstituentima na C3, C4, C7, C8 i C15 mestu. Grupe A, B i D zahvaćaju jednostavne estere i alkohole trihotecena, dok grupa C zahvata makrocikličke toksine. Najvažniji i najčešći su toksini iz grupe A (T-2 toksin, HT-2 toksin, T-2 tetraol, neosolaniol, acetil T-2 toksin, diacetoksiscirpenol, 15-monoacetoksiscirpenol, scirpentriol) i grupe B (deoksinivalenol, diacetilnivalenol, fusarenon X, nivalenol, diacetildeoksinivalenol). Zbog velikog broja do danas poznatih trihotecena

i vrlo različitih osobina supstrata u kojima se nalaze, njihova simultana detekcija za zakonske, medicinske i veterinarske potrebe još uvijek nije standarizirana.

Cilj našeg rada bio je razvijanje metode za hemijsko utvrđivanje trihotecena, koja bi zahvatila što više tih materija, prisutnih u prirodnim supstratima. Prvo smo preveli pomoću hidrolize različite trihotecene iz grupe A i B u njihove odgovarajuće alkohole (scirpentriol, deoksinivalenol i T-2 tetraol), a zatim smo ih separirali i identificirali pomoću plinske kromatografije EC detektorom i masnom spektrometrijom.

## MATERIJAL I METODE

Pretražili smo 25 uzoraka više ili manje plesnivog kukuruza iz različitih delova Jugoslavije. Mikološke pretrage izvršili smo po metodama Schmita, Michustina i Trisvijatskoga (13) i metodi koja je opisana u *International Rules for Seed Test ISTA, Vol. 3* (14). Takođe smo izolirali i determinirali toksogene sojeve gljivica. Mikotoksikološke pretrage o prisustvu aflatoksina $B_1$, $B_2$, $G_2$, ohratoksina A i F-2 toksina izvršili smo metodom tankoslojne kromatografije (14). Kožni test na kunićima obavili smo modificiranom metodom (14) po Eppleyu (15). Kloroformski ekstrakt plesnivog kukuruza otparili smo do suvoga, a uljni ostatak naneli na obrijanu kožu belog kunića. Reakciju smo posmatrali vizuelno posle 24, 48 i 72 sata. Za ocenu jakosti reakcije upotrebili smo sledeće kriterije:

0 - bez reakcije;
1 - crvenilo;
2 - jako crvenilo;
3 - jako crvenilo i otok;
4 - vrlo jaka reakcija s edemom i nekrozom.

Za simultano hemijsko određivanje trihotecena u kukuruzu upotrebili smo metodu plinske kromatografije. Uzorke smo prvo ekstrahirali mešavinom acetonitrila i vode (84:16), a zatim smo ih očistili na koloni napunjenoj aktivnim ugljem, neutralnim $Al_2O_3$ i aktivnom zemljom (1:1:1), te na koloni napunjenoj neutralnim Florisilom. Aktivni ugalj uklanja većinu smetajućih materija, kao što su npr. drugi mikotoksini (aflatoksini, F-2 toksin, ohratoksini), a neutralni $Al_2O_3$ uklanja pojedine pigmente. Zatim smo pomoću NaOH sve estere trihotecena hidrolizirali u njima srodne alkohole.

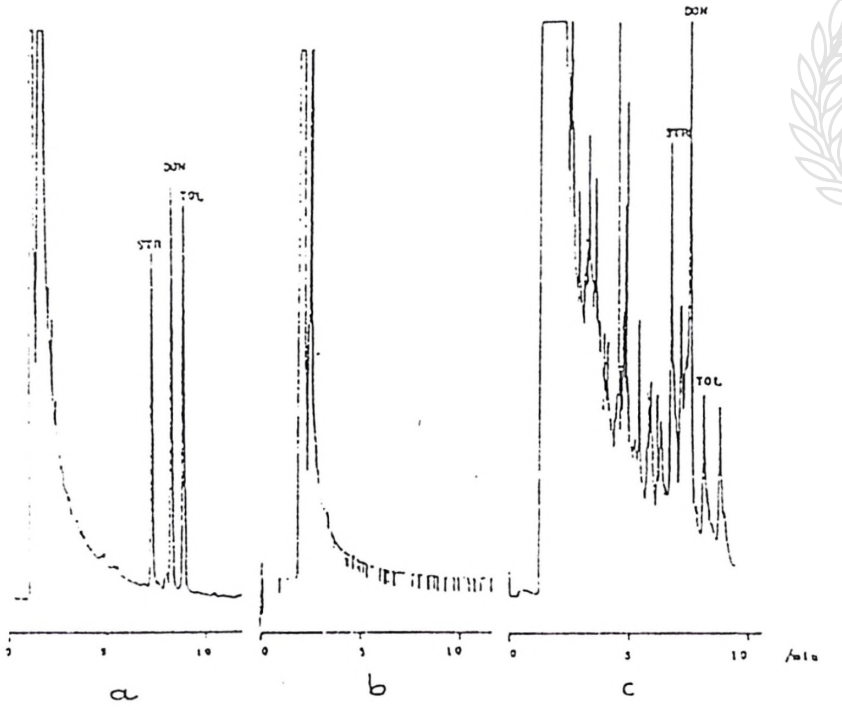
Tom metodom smo T-2 toksin i njegove metabolite pretvorili u T-2 tetraol (TOL), diacetoksiscirpenol i njegove metabolite u scirpentriol (STR), dok je deoksinivalenol (DON) ostao nepromenjen. Uslovi hidrolize su bili izabrani tako da su omogućili maksimalnu pretvorbu spomenutih toksina u TOL i STR te minimalno uticali na raspad DON. Za derivatizaciju smo upotrebili trifluorocetnu kiselinu, koja je na EC detektoru dala bolje rezultate od heptafluorbutilimidazola (17, 19, 20, 21). Separacija se odvijala na 30 m dugačkoj kapilarnoj koloni DB-5 (0,25 $\mu$m), nosivi plin bio je dušik s pretokom 1,9 ml/min, temperatura injektora bila je 220°C,

ANU BiH АНУ БиХ

Tabela 1. HIDROLIZA TRIHOTECENA

| | | |
|---|---|---|
| acetil T-2<br>T-2<br>HT-2<br>T-2 triol<br>T-2 tetraol<br>neosolaniol<br>4-diacetilneosolaniol<br>8-acetilneosolaniol | OH – | T - 2 tetraol - TOL |
| triacetoksiscirpenol<br>diacetoksiscirpenol<br>15-monoacetoksiscirpenol<br>scirpentriol | OH – | scirpentriol - STR |
| deoksinivalenol<br>3-acetildeoksinivalenol<br>15-acetildeoksinivalenol | OH – | deoksinivalenol - DON |

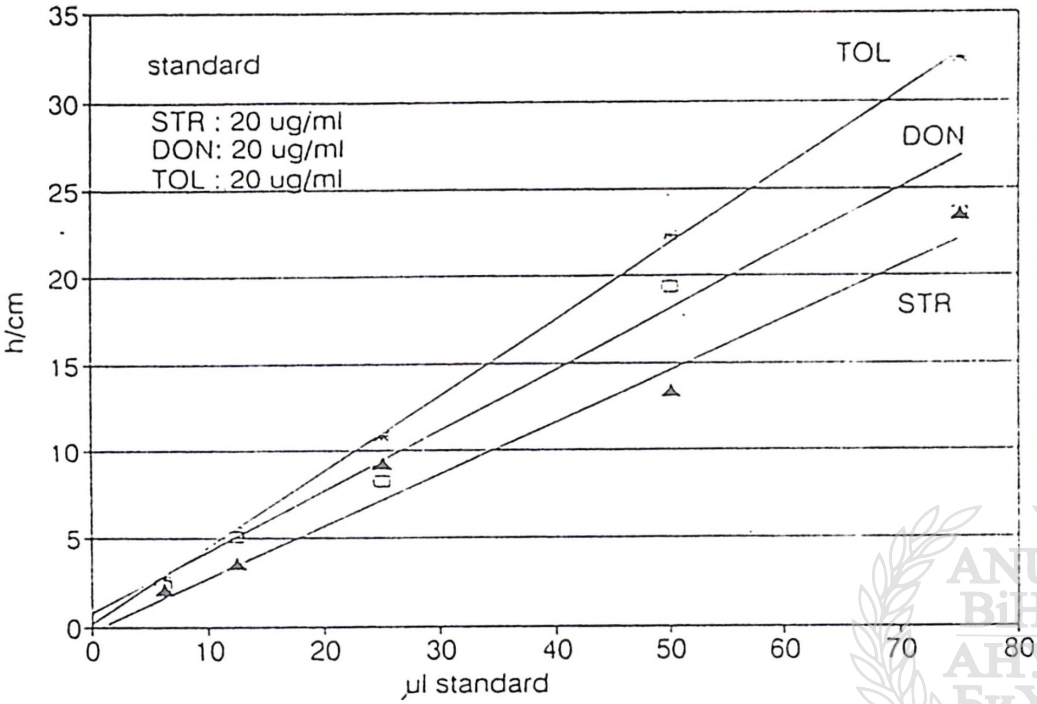
temperatura detektora 250°C, a temperatura kolone 180°C (slika 1). Dobivene rezultate smo potvrdili na plinskom kromatografu s maseno selektivnim detektorom (MSD) s elektronskom i hemijskom ionizacijom (22, 23, 24).




Slika 1. Kromatogrami a) standarda STR, DON i TOL b) zdravog kukuruza c) plesnivog kukuruza

ANU BiH АНУ БиХ

SLIKA 2: Kalibraciona krivulja standarda STR, DON i TOL




Slika 2. Kalibraciona krivulja standarda STR, DON i TOL

Kalibraciona krivulja standarda STR, DON i TOL prikazana je na slici 2. Kod izrade krivulja upotrebili smo metodu najmanjih kvadrata. Korelacijski koeficijenti i jednadžbe pravca za upotrebljene standarde prikazani su u tabeli 2. Iz nje je vidno da je korelacijski koeficijent bio najniži kod DON-a, što bi mogla biti posledica nepotpune derivatizacije. Relativna standardna devijacija za STR bila je 13,7, za DON 10,2 i za TOL 11,8.

Tabela 2. KORELACIJSKI KOEFICIJENTI I JEDNADŽBE PRAVCA

| Toksin | r | Jednadžba pravca |
|---|---|---|
| STR | 0,9959 | y = 0,3034 x - 0,2166 |
| DON | 0, 9901 | y = 0,3271 x + 0,5657 |
| TOL | 0,9998 | y = 0,4351 x + 0,0548 |

Rezultati mikoloških i mikotoksikoloških pretraga kukuruza koji je prouzrokovao različitu jačinu reakcije na koži kunića (0 do 4) prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. REZULTATI MIKOLOŠKIH I MIKOTOKSIKOLOŠKIH ISPITIVANJA PLESNIVOG KUKURUZA

| Uzorak | Broj spora gljivica u 1000/g | STR ng/g | TOL ng/g | DON ng/g | F-2 ng/g | Aflatoksin $B_1$ ng/g |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 269 | 0 | 0 | 350 | | |
| 2 | 233 | 0 | 0 | 470 | | |
| 3 | 62 | 170 | 0 | 0 | | |
| 4 | 42 | 0 | 0 | 90 | | |
| 5 | 44 | 0 | 0 | 0 | | |
| 6 | 336 | 0 | 0 | 0 | | |
| 7 | 116 | 0 | 0 | 100 | | |
| 8 | 311 | 10 | 20 | 620 | | |
| 9 | 241 | 0 | 0 | 380 | 1200 | 0 |
| 10 | 405 | 140 | 0 | 80 | 1000 | 20000 |
| 11 | 183 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 260 | 0 | 0 | 90 | 0 | 0 |
| 13 | 300 | 920 | 0 | 160000 | 12000 | 3600 |
| 14 | 880 | 0 | 810 | 0 | 10100 | 0 |
| 15 | 775 | 0 | 0 | 730 | 0 | 0 |
| 16 | 1554 | 220 | 80 | 630 | 0 | 0 |
| 17 | 525 | 660 | 0 | 12900 | 12100 | |
| 18 | 57 | 0 | 4300 | 120 | 0 | 0 |
| 19 | 494 | 0 | 560 | 3120 | 1800 | 30000 |
| 20 | 425 | 0 | 0 | 490 | 12000 | 0 |
| 21 | 290 | 0 | 1800 | 27400 | 0 | 0 |
| 22 | 505 | 230 | 150 | 0 | 6000 | 0 |
| 23 | 123 | 560 | 430 | 0 | 6000 | 0 |
| 24 | 98 | 1000 | 360 | 1260 | 3800 | |
| 25 | 786 | 620 | 360 | 28290 | | |

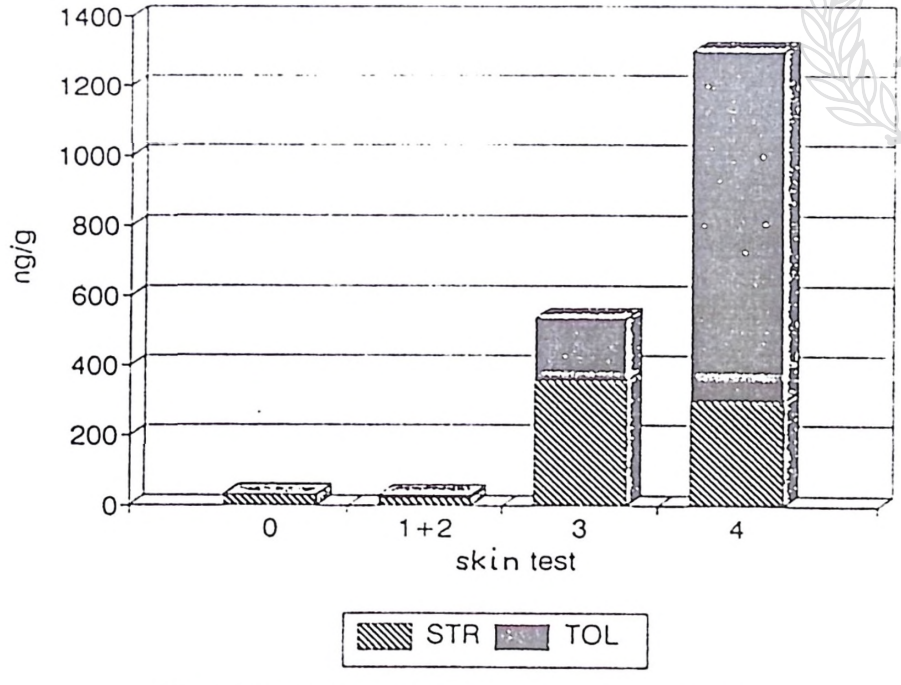
U 1 g uzorka pronašli smo od 42.000 do 1.545.000 spora gljivica. Broj gljivica nije bio proporcionalan prisustvu toksina u kukuruzu. To se podudara s podacima iz literature (3, 5), u kojoj se navodi da gljivice mogu odumreti, dok njihovi toksički metaboliti, zbog svoje stabilnosti, ostaju nepromenjeni. Od gljivica koje proizvode trihotecene, izolirali smo 6 sojeva *Fusarium oxysporum*, 5 sojeva *Fusarium graminearum*, 5 sojeva *Fusarium moniliforme Sheldon*, po jedan soj *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium rigidiusculum* i *Fusarium poae*, 3 soja *Trichoderma harzianum Rifai*, 3 soja *Trichoderma roseum* i jedan soj *Epicoccum species*.

Od mikotoksina su bili u kukuruzu najčešće prisutni DON i njegovi metaboliti (72%), u prosječnoj koncentraciji 9.485 ng/g (80 do 160.000 ng/g). DAS i njegovi metaboliti su bili utvrđeni u 40% pretraženih uzoraka, u prosječnoj količini 180 ng/g (10 do 1.000 ng/g), a T-2 toksin i njegovi metaboliti u 44% uzoraka, u prosječnoj količini 356 ng/g (20 do 4.300 ng/g). Uz trihotecene je 50% uzoraka sadržavalo F-2 toksin, u količini od 500 do 12.100 ng/g, aflatoksin $B_1$ je bio utvrđen u 3 uzorka (3,6 do 30 ng/g) a ohratoksin A u jednom uzorku (34 ng/g).

Spomenuti rezultati samo se delimično slažu s rezultatima naših prethodnih istraživanja, u kojima smo metodom TLC pronašli manju kontaminaciju stočne hrane T-2 toksinom, DAS i DON (14, 25). Smatramo da su razlike nastale zbog veće osjetljivosti GC-ECD metode, koja omogućava detekciju i do 100 puta manjih količina tih toksina (26). Opisanom metodom smo, pored toksina T-2, DAS i DON, obuhvatili i većinu njihovih metabolita.

Prema podacima iz literature, kontaminacija kukuruza i stočne hrane trihotecenima predstavlja ozbiljan problem u svetu. U SAD je Versonder (27) pronašao DON u 46% pregledanih uzoraka kukuruza (1,5 do 10 mg/kg). Cotte i sar. (28) izveštavaju o 72% kontaminaciji kukuruza DON u koncentracijama od 0,1 do 41,6 mg/kg. U osporljivoj pšenici je Hadler (29) otkrio 94% kontaminaciju DON. U Engleskoj (30) je kontaminacija tim toksinom bila u koncentracijama od 0,02 do 0,4 mg/kg, utvrđena samo u 16% pretraženih uzoraka. Mnogi autori izveštavaju o kontaminaciji stočne hrane trihotecenima i u drugim državama (31, 32). Nivalenol su pronašli u pojedinim državama Evrope i Azije, dok su se T-2 toksin i DAS javljali samo povremeno (33).

Jugoslavenski istraživači su utvrdili relativno mali broj uzoraka stočne hrane kontaminirane dermatoksičkim trihotecenima. Balzer (34) je otkrio T-2 toksin u 8,3% (0,5 do 5,0 mg/kg), a Pepeljnjak (35) u 7,5% pretraženih uzoraka kukuruza (0,16 do 0,46 mg/kg). Isti autor je T-2 toksin pronašao i u 20% pretraženih uzoraka ječma (prosječno 0,16 mg/kg) te u 15,7% pretraženih uzoraka hrane za goveda (0,2 do 0,8 mg/kg).




Slika 3. Rezultati kožnog testa i hemijske pretrage uzoraka

ANU BiH АНУ БиХ

Upoređenje jačine kožne reakcije (slika 3) i prisustva dermatoksičkih trihotecena (izraženih kao scirpentriol i T-2 tetraol) je pokazalo signifikantnu korelaciju r= 0,6, P<0,005. Uzorci broj 15 i 20 su prouzrokovali jaku kožnu reakciju, ali nisu sadržavali spomenute toksine. Verovatno su bili prisutni drugi dermatoksički agensi koje upotrebljenom metodom određivanja nismo obuhvatili. Nijednom od uzoraka bez ili sa slabom kožnom reakcijom nismo ustanovili veće količine STR i TOL.

## ZAKLJUČAK

Izvršene su pretrage kontaminacije kukuruza mikotoksinima iz grupe trihotecena. Veliki broj trihotecenskih metabolita smo pretvorili u odgovarajuće alkohole: scirpentriol (STR), deoksinivalenol (DON) i T-2 tetraol (TOL) s namerom da se poveća analitička osetljivost i omogući simultana detekcija većine trihotecena iz grupe A i B. Utvrdili smo da je najniža detekcijska granica za zdrav kukuruz 10 ng/g, a za jako plesniv kukuruz 100 ng/g.

Separaciju trihotecena pomoću kapilarne plinske kromatografije s EC detektorom smo potvrdili masenom spektrometrijom. U 25 uzoraka plesnivog kukuruza najčešće je bio prisutan DON i njegovi metaboliti (72%), u prosečnoj koncentraciji 9.485 ng/g (80 do 160.000 ng/g). DAS i njegovi metaboliti su bili utvrđeni u 40% primera, u prosečnoj količini 181 mg/g (10 do 1.000 ng/g), a T-2 toksin i njegovi metaboliti u 44% primera, u prosečnoj količini 356 ng/g (20 do 4.300 ng/g). Pored trihotecena, bio je u 50% uzoraka pronađen toksin F-2 u koncentraciji od 500 do 12.100 ng/g, u 3 uzorka aflatoksin $B_1$ (3,6 do 30 ng/g) a u jednom uzorku ohratoksin A (24 ng/g). Upoređenje jačine kožne reakcije i prisustva dermatoksičkih trihotecena u uzorcima je pokazala signifikantnu korelaciju (r=0,6, P<0,005). Ni u jednom od uzoraka bez ili sa slabom kožnom reakcijom nisu bile hemijski utvrđene veće količine dermatoksičkih toksina.

## SIMULTANEOUS DETECTION OF DON, DAS AND T-2 TOXIN AND THEIR METABOLITES IN MAIZE

*S u m m a r y*

The contamination of corn with mycotoxins from trichothecene group was studied. A great number of metabolites of trichothecene toxins were converted to their corresponding alcohols scirpentriol (STR), deoxynivalenol (DON) and T-2 tetraol (TOL), in order to incrise analytical sensitivity and to detect simultaneusly the majority of trichothecene from group A and B. Detection limit from 10 ng/g for normal corn to 100 ng/g for very mouldy corn were estimated. Separation of trichothecenes by capillary gas chromatography with electron capture detector was comfirmed by mass spectrometry. In 25 samples of mouldy corn DON and its metabolites were the most frequent (72%) in average concentration of 9485 ng/g (from 80 to 160000 ng/g). DAS and its metabolites were stated in 40% of cases in average of 181 ng/g

(from 10 to 1000 ng/g) and T-2 toxin and its metabolites in 44% of cases in average 356 ng/g (from 20 to 4300 ng/g). Besides trichothecenes in 50% of samples F-2 toxin in concentration from 500 to 12100 ng/g, aflatoxin B1 in three samples (3.6 to 3o ng/g) and ochratoxin in one sample (24 ng/g) were also found. Comparision between intensity of skin reaction and dermatoxic trichothecenes content showed correlation r= 0.6, which is significant for P<0.005. In no sample without or with weak dermatoxic effect greater quantities of dermatoxic toksins were chemically proved.

## LITERATURA


(1) *Mycotoxins: economic and health risks*. Task force report (Council for agricultural science and technology), No. 116, November 1989, Ames, Iowa, USA.

(2) Wyllie T. D., L. G. Morehouse (1977): *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*. Vol. 1. Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins. New York; Basel: Dekker

(3) Lacey J. (1985): *Trichothecenes and other Mycotoxins*. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore: J.Wiley & Sons.

(4) Shepherd M. J., J. Gilbert (1986): *Fusarium mycotoxins in cereals and other stored products*. International Biodeterioration Supp., 2; 61-69.

(5) Smith J. E., Moss M. O. (1985): *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance.* Chichester; New York: Brisbane; Toronto; Singapore: J.Wiley & Sons.

(6) Eppley R. M., W. Bailey (1973): *12, 13-epoxy trichothecenes as the probable mycotoxins responsible for stahybotryotoxicosis*. Science, 181; 758-760.

(7) Burmeister H. R., J. J. Ellis, S. G. Yates (1971): *Correlation of biological to chromatographic date for two mycotoxins elaborated by Fusarium*. Appl. Microbiol., 21; 673-675.

(8) Mirocha C. J. (1979): *Trichothecene toxins produced by Fusarium*. Conference on mycotoxins in animal feeds and grain related to animal health. Food and drug administration, Rockville, 288-373.

(9) Ueno Y. (1984): *Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes*. Fundam. Appl. Toxicol., 4: 124-132.

(10) Mirocha C. J., S. Pathre (1973): *Identification of the toxic principle in a sample of poaefusarin*. Appl. Microbiol., 266; 719-724.

(11) Kubena L. F. et al. (1987): *Effect of feeding mature white leghorn hens dieto that contain DON*. Poultry Sci., 66.

(12) Snyder A. P. (1984): *Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene*, 579, 583.

(13) Misustin E. N., L. A. Trisvjatskij (1963): *Mikrobi i zerno*, Moskva.

(14) Vengušt A. (1985): *Etiologija mikotoksikoz pri domačih živalih v Sloveniji*. Doktorska disertacija, Ljubljana.

(15) Epply R. M.(1968): *Screening method for zearalenon, aflatoxin and ochratoksin*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51; 1, 74-78.

(16) Romer T. R.(1986): *Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds.* J.Assoc. Off. Anal.Chem., 69; 4, 699-703.

(17) Rood H. D., S. P. Swanson, W. B. Buck (1986): *Rapid screening procedure for the detection of trichothecenes in plasma and urine.* J.Chomatogr., 378: 375-383.

(18) Trucksess M. W., S. Nesheim, R. M. Eppley (1984): *Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol.* J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67; 1, 40-45.

(19) Rood H. D., W. B. Buck, S. P. Swanson (1988): *Gas chromatographic screening method for T-2 toxin,* DAS DON, and related trichothecenes in feeds. J.Assoc. Off. Anal.Chem., 71; 3, 493-498.

(20) Rood H. D., W. B. Buck, S. P. Swanson (1988): *Diagnostic screening method for the determination of trichothecene exposure in animals.* J.Agric. Food Chem., 36: 74-79.

(21) Kientz C. E., A. Verweij (1986): *TMS and TFA of a number of trichothecenes followed mby gas chromathographic analysis mon fused silica capillary columns.* J. Chromatogr., 355: 229-240.

(22) Krishnamurthy T., E. W. Sarver (1986): *Mass spectral investigations on trichothecenes mycotoxins.* III. Synthesis, characterization and application of pentafluorpropionyl and trifluoroacetyl esters of simple trichothecenes. J.Chromatogr., 355: 253-264.

(23) Mirocha C. J., R. A. Pawlosky, K. Chatterjee, S. Watson, W. Hayes (1983): *Analysis for Fusarium toxins in various samples implicated in biological warfare in Sautheast Asia.* J.Assoc. Off.Anal. Chem., 66; 6, 1485-1499.

(24) Gareis M., J. Bauer und Brigitte Gedek (1985): *Fusarientoxine in Futtermitteln.* Nachweis und Vorkommen von trichothecene. Tierrztl. Praxs., 1; 8-19.

(25) Žust J., A. Vengušt, U. Pestevšek, N. Klemenc, Zvonka Kabaj, (1989): *Kontaminacija stočne hrane mikroorganizmima.* Krmiva, 31; 5-6, 93-103.

(26) Kabaj-Tomšič, Z. (1991): *Analiza trihotecenov v koruzi.* Magistersko delo, Ljubljana.

(27) Vesonder R. F., A. Ciegler, A. H. Jensen (1973): *Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn.* Appl. Microbiol., 26; 6, 1008-1010.

(28) Cote L. M., J. D. Reynolds, R. F. Vesonder, W. B. Buck, S. P. Swanson, R. T. Coffei, D. C. Brown (1984): *Survey of vomitoxin - contaminated feed grains in midwestern United States and associated health problems in swine.* J.Am. Vet. Med. Assoc., 184; 2, 139-192.

(29) Hagler W. M., K. Ticzkowska, P. B. Hamilton (1984): *Simultaneus occurrence of deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the midwestern United States.* Appl. Environ. Microbiol., 47; 1, 151-154.

(30) Jelinck C. F., A. E. Pohland, and G. E. Wood (1989): *Worldwide occurrence of mycotoxins in food and feeds - An update.* J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72; 2, 223-230.

(31) Bauer J. (1982): *Mycotoxicosen in der tierischen Production Bedentung und Diagnose.* Berl. Mnch. Tierrztl. Wschr. 95; 301-307.

(32) Hamid A. M., A. Hamid (1983): *Occurrence of vomitoxin in Egyptian foods and feeds.* Int. mycotoxin. conf. Food and drug administration, Cairo.

(33) Lacey J., ed. (1985): *Trichothecenes and other mycotoxins.* Chichester; J.Willey & Sons.

(34) Balzer I., C. Bogdanić, S. Pepeljnjak (1978): *Rapid thin layer chromathographic method for determining aflatoxin $B_1$, ochratoxin A and zearalenone in corn.* J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 61; 584-584.

(35) Pepeljnjak S., Z. Cvetinić (1981): *Ohratoksogenost sojeva Aspergillus ochraceus vrste s područja endemske nefropatije.* Vet. arh., 51; 101-103.

ANU BiH АНУ БиХ