

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
VETERINARIJOS AKADEMIJA

Jurgita Jovaišienė

**SILOSUOTŲ PAŠARŲ HIGIENINIŲ
RODIKLIŲ IR MIKROSKOPINIŲ GRYBŲ
ANTRINIŲ METABOLITŲ TYRIMAI
BEI RIZIKOS GALVIJŲ
SVEIKATINGUMUI ĮVERTINIMAS**

Daktaro disertacija
Žemės ūkio mokslai,
veterinarija (02A)

Kaunas, 2017

Disertacija rengta 2011–2016 metais Lietuvos sveikatos mokslų universitete Veterinarijos akademijoje, Maisto saugos ir kokybės katedroje, Gyvūnų gerovės tyrimų laboratorijoje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Bronius Bakutis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Veterinarijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Rasa Želvytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A)

Nariai:

prof. dr. Gražina Januškevičienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A);

prof. dr. Gražina Juodeikienė (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – 05T);

prof. dr. Ingrida Monkevičienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A);

prof. habil. dr. Cezary Purwin (Olštyno Varmijos Mozūrų universitetas (Lenkija), žemės ūkio mokslai, zootechnika – 03A).

Disertacija bus ginama viešame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 m. birželio 23 d. 13 val. dr. S. Jankausko auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
VETERINARY ACADEMY

Jurgita Jovaišienė

**EVALUATION OF HYGIENIC
INDICATORS OF ENSILED FEED
AND SECONDARY METABOLITES
OF FUNGI AND RISK ASSESSMENT
FOR CATTLE HEALTH**

Doctoral Dissertation
Agricultural Sciences,
Veterinary (02A)

Kaunas, 2017

Dissertation has been prepared at the Department of Food Safety and Quality, at the Animal Welfare Research Laboratory of Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences, during the period of 2011–2016.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Bronius Bakutis (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A)

Dissertation is defended at the Veterinary Research Council of Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Prof. Dr. Rasa Želvytė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A)

Members:

Prof. Dr. Gražina Januškevičienė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A);

Prof. Habil. Dr. Gražina Juodeikienė (Kaunas University of Technology, Technological Science, Chemical Engineering – 05T);

Prof. Dr. Ingrida Monkevičienė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A);

Prof. Habil. dr. Cezary Purwin (University of Warmia and Mazury in Olsztyn (Poland), Agricultural Sciences, Zootechnics – 03A).

Dissertation will be defended at the open session of the Veterinary Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on the 23th of June, 2017 at 1:00 PM in Dr. S. Jankauskas Auditorium of the Veterinary Academy.

Adress: Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SUTRUMPINIMAI	7
IVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Europoje ir Lietuvoje silosuotų pašarų gamyba.....	13
1.2. Žaliavų ir iš jų gaminamų silosuotų pašarų higieninė kokybė	13
1.3. Mikroskopinių grybų paplitimas siloso žaliavose ir silosuotuose pašaruose	18
1.4. Mikotoksinų paplitimas siloso žaliavose ir silosuotuose pašaruose.....	22
1.5. Mikotoksinų poveikis galvijų organizmui	24
1.6. Priemonės, mažinančios mikotoksinų koncentracijas ir mikroskopinių grybų vystymąsi silosuotuose pašaruose.....	28
1.7. Mikotoksinius detoksikuojančios priemonės ir medžiagos.....	30
2. DARBO METODIKA.....	32
2.1. Tyrimų laikas ir vieta.....	32
2.2. Žaliavos ir iš jos pagaminto siloso mėginių paėmimas.....	34
2.3. Žaliavų ir iš jų gamintų silosuotų pašarų higieninių rodiklių nustatymas.....	35
2.4. Mikotoksinų nustatymo metodai.....	38
2.5. Siloso ir jo žaliavos cheminės fermentacinės sudėties tyrimo metodika	40
2.6. Mikotoksinų toksiškumo įvertinimas in vitro	41
2.7. Mikotoksinais užterštų pašarų poveikio melžiamoms karvėms įvertinimas bei detoksikuojančio preparato efektyvumas	46
2.8. Augalinių ekstraktų, kaip profilaktinių priemonių, panaudojimas siloso higieninei kokybei pagerinti	47
2.9. Statistinis duomenų įvertinimas.....	49
3. TYRIMŲ REZULTATAI	50
3.1. Kukurūzų žaliavos ir iš jos pagaminto siloso, paimto skirtingais laikotarpiais po sudėjimo, higieninė kokybė, užterštumas mikroskopiniais grybais, mikotoksinais, biogeniniais aminais	50
3.2. Daugiamečių žolių ir iš jų pagamintų bei į ritinius susuktų silosuotų pašarų iš ekologinių ir įprastinės gamybos ūkių higieninė kokybė, užterštumas mikroskopiniais grybais, mikotoksinais, biogeniniais aminais	55
3.3. Mikroskopinių grybų identifikavimas ir jų toksiškumo nustatymas PGR metodu	60
3.4. Žaliavų ir iš jų silosuotų pašarų higieninių rodiklių koreliacija su cheminiais fermentaciniais rodikliais.....	61
3.5. Savikontrolės tikslu ir problemineis atvejais tirtų pašarų užterštumas mikotoksinais.....	62
3.6. Silosuotų pašarų, užterštų mikotoksinais, bei kristalinių mikotoksinų citotoksiškumo įvertinimas organų taikinių ląstelių kultūroms	67

3.7. Natūraliai mikotoksinais užterštų pašarų poveikis melžiamoms karvėms ir detoksikuojančio preparato efektyvumo įvertinimas	74
3.8. Augalinių ekstraktų, kaip profilaktinių priemonių, panaudojimas gerinant siloso higieninę kokybę	76
4. REZULTATŲ APTARIMAS	81
4.1. Žaliavų ir iš jų gaminamų silosuotų pašarų, paimtų skirtingais laikotarpiais po sudėjimo iš skirtingas ūkininkavimo sistemas taikančių ūkių, higieninė kokybė	81
4.1.1. Kukurūzų žaliavos ir iš jos gaminamų silosuotų pašarų higieninė kokybė	81
4.1.2. Ekologiniuose ir įprastinės gamybos ūkiuose į ritinius susuktų silosuotų pašarų higieninė kokybė	85
4.1.3. Mikroskopinių grybų identifikavimas ir jų toksiškumo nustatymas molekuliniiais metodais	87
4.2. Higieninių rodiklių koreliacija su cheminiais fermentaciniais rodikliais silosuotuose pašaruose	87
4.3. Savikontrolės atvejais tirtų silosuotų pašarų užterštumas mikotoksinais	89
4.4. Silosuotų pašarų, užterštų mikotoksinais, citotoksiškumo įvertinimas organų taikinių ląstelių kultūroms	91
4.5. Natūraliai mikotoksinais užterštų pašarų poveikis melžiamoms karvėms ir detoksikuojančių preparatų efektyvumo įvertinimas	94
4.6. Augalinių ekstraktų, kaip profilaktinių priemonių, panaudojimas, gerinant siloso higieninę kokybę	95
IŠVADOS	97
REKOMENDACIJOS	100
LITERATŪROS ŠALTINIAI	101
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	112
PUBLIKACIJA I (PUBLICATION I)	115
PUBLIKACIJA II (PUBLICATION II)	124
PUBLIKACIJA III (PUBLICATION III)	130
SUMMARY	139
CURRICULUM VITAE	159
PADĖKA	160

SUTRUMPINIMAI

ADF	– rūgščiame tirpale išplauta ląsteliena
AFB ₁	– aflatoksinas B ₁
AF	– aflatoksinas (bendrai)
AFM ₁	– aflatoksinas M ₁
ATCC	– Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija (angl. <i>American Type Culture Collection</i> , ATCC)
A.R.	– aptikimo riba (angl. term. trumpinys LOD)
a _w	– laisvojo vandens aktyvumas pašare
BA	– biogėniniai aminorai
BHK-21 ląstelių linija	– Sirijos žiurkėno vienos dienos amžiaus individo inkstų ląstelės (angl. <i>baby hamster kidney fibroblasts</i>)
bp	– bazių pora
CO ₂	– anglies dvideginis
ČA	– <i>Czapek-Dox Modified Agar</i>
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
DON	– deoksinivalenolis
EE	– etanolinis ekstraktas
gr	– gramai
ha	– hektaras
IC ₅₀	– mėginio koncentracija, sukelianti pusės (50 proc.) ląstelių biologinių ar biocheminių funkcijų netekimą (angl. <i>inhibitory concentration</i>)
IgA	– imunoglobulinas A
kg	– kilogramai
ksv/g	– kolonijas sudarantys vienetai grame
KV	– kristalvioletinis dažas
mėn.	– mėnesis
mg/kg	– miligramai kilograme
mln. t	– milijonai tonų
m/o	– mikroorganizmai
NaCl	– natrio chloridas
ng	– nanogramai
NDF	– neutraliame tirpale išplauta ląsteliena
N.R.	– nustatymo riba (angl. term. trumpinys LOQ)
NH ₃ -N	– amoniakinis azotas
p	– patikimumo kriterijus
pav.	– paveikslas
pH	– vandenilio jonų koncentracija
PGR	– polimerazės grandininė reakcija
ppb	– µg/kg
ppm	– milijoninė dalis (angl. <i>part per million</i>)
proc.	– procentai
PSCh	– plonasluoksni chromato grafija
r.	– rūgštis
Rf	– pasiskirstymo koeficientas (angl. <i>retention factor</i>)
SA	– <i>Sabouraud dextrose agar</i>

SKN	–	standartinė klimato norma
SM	–	sausosios medžiagos
SSN	–	santykinis standartinis nuokrypis
spp.	–	po genties pavadinimo vartojamas pažymėti visas toje gentyje esančias rūšis
T-2	–	T-2 toksinas
TFA	–	fermentinių rūgščių suma
TMR	–	viso raciono pašaro mišinys (ang. <i>total mix ration</i>)
LRR	–	lakiosios riebalų rūgštys
VE	–	vandeninis ekstraktas
ZEA	–	zearalenonas
µg	–	mikrogramai
µmol	–	mikromoliai
OT	–	ochratoksinai (bendrai)
OTA	–	ochratoksinas A

IVADAS

Lietuvoje mėsos, pieno ūkiai vieni iš prioritetinių žemės ūkio šakų, orientuoti vidaus ir užsienio rinkoms, o galvijininkystė – vis dar pirmaujanti gyvulininkystės šaka. Tam įtakos turi tinkamos Lietuvos gamtinės sąlygos, gyvulių auginimo tradicijos. Gyvulininkystės produktų gamyba užima labai svarbią vietą Europos žemės ūkio sektoriuje. Geri šios veiklos rezultatai labai priklauso nuo to, ar naudojami saugūs ir geros kokybės pašarai. Aukštas žmonių ir gyvūnų sveikatos apsaugos lygis yra vienas iš svarbiausių maisto teisės (EB) Nr. 183/2005 tikslų [132].

Europos Sąjungos šalyse keliama dideli saugumo reikalavimai pašarams. Jie neturi būti užteršti biologinėmis, cheminėmis ir fizinėmis priemaisomis. Nuo 2005 metų įsigaliojo Pašarų higienos reglamentas (EB 183/2005), kurio privalo laikytis visos ES šalys, taip pat ir Lietuva. Higienos reikalavimai taip pat yra taikomi ir pirminei pašarų gamybai, prie kurios yra priskiriamas žolių ir kitų žaliųjų augalų konservavimas (silosavimas), užtikrinantis pašaro higieninę kokybę. Į rekomendacijas geros praktikos gairėms turi būti įtraukta ir mikotoksinų kontrolė šalia kitų pavojų, kylančių pirminės pašarų gamybos metu, nes šie toksiniai junginiai turi neigiamą poveikį žmonių ir gyvūnų sveikatai, sukelia vidaus rinkos ir tarptautinius ekonominius nuostolius [124, 132].

Svarbiausias pašaras galvijams ir karvėms yra žoliniai (žalieji) pašarai. Lietuvoje yra pakankama pašarų bazė galvijams auginti. Kultūrinės ir natūralios ganyklos bei pievos šalyje sudaro apie 14 proc. žemės ūkio naudmenų. Vidutiniškai 1 karvei tenka 1,2 ha pievų. Per 2009 metus pašarinių šakniavaisių, žolės, šieno, kukurūzų siloso pagaminta apie 1,5 mln. t, kurių pakanka esamai galvijų bandai išlaikyti ir didinti [106]. Šiuolaikinių technologijų metu daugėja intensyvių ūkių, kuriuose gyvuliai visus metus šeriami paruoštais, mechanškai apdorotais pašarais, nebeginant į ganyklas [79]. Tačiau ir ekologiniai ūkiai be konservuotų ar kitaip mechanškai pagamintų pašarų neišsiverstų, nes Lietuvoje žolių ir kitų žaliųjų pašarinių augalų vegetacija trunka tik 5–5,5 mėnesio. Sezoninis šių augalų augimas neišvengiamai verčia juos konservuoti, kad būtų sukaupta pašarų galvijų laikymo tvartiniam laikotarpiui, kuris tęsiasi apie 210 dienų. Kita vertus, žolės ir kiti žalieji augalai pasižymi augimo sezoniškumu, t. y. pavasarį ir vasaros pradžioje žolės auga labai intensyviai, ir viso derliaus neįmanoma gyvuliams sušerti. Todėl augalų perteklius jų intensyvios vegetacijos metu turi būti konservuojamas [80]. Siloso gamyba – vienas iš senesnių pašarų gamybos metodų, taikoma norint išvengti mikroorganizmų, įskaitant ir mikroskopinių grybų, dauginimosi ir jų sukeltą žalingą poveikį.

Atsižvelgiant į šių pašarų sunaudojimo mastą ir svarbą gyvūnų mitybai, dėmesys jų kokybei ir saugai šiuo metu yra nepakankamas. Gaminamų žolinių pašarų kokybė visos šalies mastu nėra sistemingai mokslškai tirama. Turimi mokslinių tyrimų duomenys rodo, kad galvijų mitybai naudojamo šieno ir siloso kokybė dažniausiai yra gana bloga, nes ne visuomet laikomasi šių pašarų gamybos technologinių reikalavimų, pašarų gamybai, naudojama ne pačios geriausios kokybės ir ne labiausiai tinkama žaliava. Turimi fragmentiškų tyrimų duomenys neleidžia objektyviai įvertinti esamos situacijos. Todėl yra būtina daugiau dėmesio skirti minėtų pašarų kokybės ir saugos klausimams, kadangi šeriant netinkamos kokybės pašarais mažėja gyvūnų produktyvumas, kyla pavojus gyvūnų bei žmonių sveikatai [84]. Gyvulių sveikatingumą įtakoja daugelis veiksnių. Svarbiausi jų – tai laikymo sąlygos, priežiūra ir pašarai. Pastaruoju metu, kintant klimatinėms sąlygoms, suaktyvėjo nepageidaujamų mikroorganizmų, o tarp jų ir mikroskopinių grybų, paplitimas bei vystymasis, kurie, esant tam palankioms sąlygoms ar patiriant „stresą“, geba produkuoti į toksiškus žmonėms ir gyvuliams junginius – mikotoksinus [42, 46].

Nežiūrint į tai, kad, norint sumažinti ar pilnai apsaugoti pašarus nuo nepageidaujamų mikroorganizmų taršos, derliaus nuėmimo, sandėliavimo metu yra taikoma daug prevencinių priemonių, tai neužtikrina visapusės apsaugos, net ir taikant Gerus praktikos metodus [83].

Iki šiol Lietuvoje yra mažai tyrinėta ir analizuota žaliavų ir iš jų pagamintų silosuotų pašarų higieninė kokybė. Nėra tyrinėti mikotoksinių koncentracijų pokyčiai nuo žaliavos iki skirtingų periodų po sudėjimo, taikant skirtingas silosavimo technologijas, bei ūkininkavimo sistemas. Taip pat nėra įvertinta, kokį poveikį gyvūnų sveikatingumui gali sukelti didžiausios ir vidutinės mikotoksinių koncentracijos, nustatytos Lietuvoje pagamintuose silosuotose pašaruose. Šeriant gyvulius pašarais, užterštais sąlyginai nedidelėmis mikotoksinių koncentracijomis, tačiau ilgą laiką, neigiamas mikotoksinių poveikis gyvulio sveikatingumui bei produkcijai nėra galutinai aiškus. Nustačius šių nepageidaujamų junginių koreliacijas su cheminiais ir fermentaciniais rodikliais, galima įvertinti jų susidarymo riziką, taip apsaugant nuo jų patekimo ant šėrimo stalo.

Darbo tikslas

Ištirti Lietuvoje užaugintų žaliavų ir iš jų pagaminto siloso higieninę kokybę, mikotoksinių koncentracijas juose bei įvertinti riziką galvijų sveikatingumui.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti ir palyginti žaliavų, iš jų gaminamų silosuotų pašarų higieninius rodiklius ir mikotoksinų lygį skirtingais laikotarpiais po sudėjimo bei taikant skirtingas ūkininkavimo sistemas.
2. Nustatyti koreliacijas tarp siloso higieninių rodiklių ir cheminių bei fermentacinių rodiklių.
3. Išanalizuoti 2011–2015 metais silosuotų pašarų savikontrolės ir problemineis atvejais pristatytų į Gyvūnų gerovės tyrimų laboratoriją mikotoksinų koncentracijas.
4. Įvertinti atskirų mikotoksinų bei silosuotų pašarų, užterštų mikotoksinais, poveikį įvairioms organizmo sistemoms, panaudojant skirtingas audinių kultūras *in vitro*.
5. Įvertinti natūraliai mikotoksinais užterštų pašarų poveikį melžiamoms karvėms *in vivo* ir detoksikuojančio preparato efektyvumą.
6. Ištirti augalinių ekstraktų panaudojimo galimybes siloso higieninei kokybei pagerinti.

Darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Iki šiol Lietuvoje nėra atlikta tyrimų apie silosuotų pašarų ir jų žaliavų higieninę kokybę bei nepageidaujamų mikroorganizmų, tarp jų ir mikroskopinių grybų bei jų antrinių metabolitų, paplitimą juose bei šiuose pašaruose nustatytų mikotoksinų koncentracijų poveikį galvijų sveikatingumui *in vivo* ir *in vitro*. Tokie tyrimai atlikti pirmą kartą. Šiame darbe nustatytos mikotoksinų koncentracijos kukurūzų žaliavos ir siloso mėginiuose skirtingais laikotarpiais po sudėjimo surinktuose iš skirtingų ūkių, esančių skirtinguose Lietuvos regionuose. Apžvelgti mikroskopinių grybų antrinių metabolitų paplitimo skirtumai į ritinius susuktame daugiamečių žolių silose, taikant skirtingas ūkininkavimo sistemas. Buvo nustatyta, kaip kito, taikant skirtingas silosavimo technologijas, silosuotų pašarų higieninė kokybė bei mikotoksinų koncentracijos silosuotame pašare nuo jų žaliavos iki skirtingų laikotarpių po sudėjimo. Tai ypač aktualu vertinant pašarų iš ekologinių ūkių kokybę ir saugą, nes yra mažai atlikta mokslinių darbų šioje srityje tam, kad įvertinti galimą riziką, susijusią su higienine kokybe. Žinant, kuriais laikotarpiais po siloso sudėjimo labiausiai pakinta higieninė jo kokybė, o ypač mikotoksinų koncentracija, galima apsaugoti silosą nuo mikotoksinų patekimo į gyvūno organizmą ar sumažinti jų neigiamą poveikį naudojant atitinkamas detoksikuojančias priemones. Šie tyrimai leidžia ne tik suprasti mikotoksinų patekimo kelius į gyvulio organizmą, o per produkciją ir į žmogaus mitybos grandinę, bet ir įvertinti rizikos mastą gyvulių ir žmonių sveikatai. Mūsų atliktų tyrimų rezultatai gali prisidėti prie taip

reikalingų tyrimų visumos, norint nustatyti leistinas maksimalias mikotoksinų koncentracijas pašaruose.

Atlikta koreliacinių ryšių paieška tarp higieninių ir cheminių bei fermentacinių rodiklių, kas yra svarbu nagrinėjant higieninius pokyčius, o ypač mikotoksinų susidarymo dėsningumus nuo siloso žaliavos iki sandėliavimo pabaigos. Įvertintas vaistinių ekstraktų panaudojimas *in vitro*, kaip higieninį lygį stabilizuojanti priemonė.

Darbo apimtis

Darbą sudaro įvadas, literatūros apžvalga, darbo metodikos aprašymas, tyrimų rezultatai, rezultatų aptarimas, išvados, rekomendacijos, naudoti literatūros šaltiniai (180 šaltiniai), publikacijų disertacijos tema sąrašas, dalyvavimas konferencijose, disertacijos santrauka (angl. *summary*) anglų kalba, gyvenimo aprašymas ir padėka. Darbo apimtis 160 puslapių, iliustruota 25 lentelių ir 14 paveikslų.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Europoje ir Lietuvoje silosuotų pašarų gamyba

Europos pašarų gamintojų federacijos (FEFAC) 2015 metų duomenimis, Europos Sąjungai priklausančiose šalyse kasmet pagaminama apie 475 tonos koncentruotų bei konservuotų pašarų [56]. Siloso gamyba šiuolaikiniuose galvjininkystės ūkiuose paplitusi dėl mažų gamintojų savikainų bei pašaro aukštos mitybinės vertės [177].

2013 m. Lietuvos ūkiuose silosui ir žaliajam pašarui išauginta 670,4 tūkst. tonų kukurūzų bei 18,70 tūkst. tonų silosinių augalų (saulėgrąžų, lubinų, pupų, mišinių ir kt. augalų, skirtų siloso gamybai). Žaliajam pašarui augintos vienmetės ir daugiametės žolės apėmė 656,70 tūkst. ha, kukurūzai 22,70 tūkst. ha, silosiniai augalai 1,4 tūkst. ha plotus [100, 180]. Vokietijoje 2000 metais siloso pagaminta apie 76,2 mln. tonų, o šieno 2,3 mln. tonų (skaičiuojant pagal žaliavą). Kukurūzų silosas sudarė 58 proc., varpinių ir ankštinių augalų silosas 32 proc., grūdais apie 2 proc. [12]. Nyderlanduose, kukurūzų silosas galvijų dienos racioną sudaro – 50–75 proc., t. y. apie 25 kg/paroje sausosios medžiagos (SM) [55, 51]. Belgijoje žiemos metu silosas sudaro 50–80 proc. galvijų dienos raciono. Silosuojama daug augalinių žaliavų, įskaitant salyklinius grūdus, cukrinių runkelių išspaudas, tačiau dažniausiai silosuojama daugiametė žolė.

Žoliniai pašarai dažniausiai silosuojami tranšėjose, tačiau gali būti sudėti į maišus („rankoves“) ar bokštus, tai priklauso nuo ūkių valdymo sistemų bei kokie pašarai bus silosuojami. Pastaraisiais metais labai paplito silosavimas į ritinius, tai laikoma kaip alternatyva „tradiciniams“ silosavimo metodams dėl nesudėtingos technologijos, mažų gamybos sąnaudų. Šį silosavimo būdą dažnai renkasi smulkūs ūkiai [38].

1.2. Žaliavų ir iš jų gaminamų silosuotų pašarų higieninė kokybė

Įvairūs biologiniai ir technologiniai faktoriai, lemiantys silosuotų pašarų kokybę – tai pašarams naudojamų augalų botaninė sudėtis, jų brandos tarpsnis, klimatinės sąlygos, derliaus nuėmimui ir sandėliavimui taikomi būdai, dirvožemio derlingumas ir jo įdirbimo technika. Siloso kokybė ir pašarinė vertė taip pat priklauso nuo pasėlių piktžolėtumo, kenkėjų, patogeninių mikroorganizmų bei jų antrinių metabolitų, kaip pavyzdžiui mikotoksinai. Pagrindiniai cheminiai-fermentaciniai rodikliai, pagal kuriuos vertinama siloso kokybė yra šie: SM, pH, žali baltymai, amoniakinis azotas ($\text{NH}_3\text{-N}$), neutraliame tirpale išplauta ląsteliena (NDF), rūgščiame tirpale išplauta ląsteliena (ADF), žalia ląsteliena, žali pelenai. Tačiau, remiantis

naujausių mokslinių tyrimų duomenimis ir išvadomis, mikrobiologiniai rodikliai, tokie kaip bendras mikroskopinių grybų sporų skaičius, aptiktos *Aspergillus fumigatus* rūšys ir mikotoksinų (aflatoksinų, deoksinivalenolio) koncentracijos, taip pat yra svarbūs rodikliai, įtakojantys pašaro kokybę [63, 142].

1.2.1 lentelė. Silosuojamoje žaliavoje vyraujantys mikroorganizmai [118]

Mikroorganizmai	ksv/g
Bendras aerobinių bakterijų kiekis	>10 000 000
Pieno rūgšties bakterijos	10-1 000 000
Enterobakterijos	1 000-1 000 000
Mielės	1 000-100 000
Mikroskopiniai grybai	1 000-10 000
Klostridijos (endosporos)	100-1 000
Bacillos (endosporos)	100-1 000
Acto rūgšties bakterijos	100-1 000
Propiono rūgšties bakterijos	10-1 000

Siloso žaliavoje, kaip parodyta 1.2.1 lentelėje, dominuoja aerobai ir fakultatyviniai aerobai [118]. Silosutų pašarų ir jų žaliavos mikroflorą galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes: tai naudingą (pageidaujamą) ir kenksmingą-žalingą (nepageidaujamą). Pageidaujami mikroorganizmai – tai pieno rūgšties bakterijos, produkuojančios pieno rūgštį silosuotose pašaruose. Nepageidaujami mikroorganizmai į silosuotus pašarus patenka iš aplinkos, dirvožemio ar su išmatomis, pažeidus gamybos ar sandėliavimo technologinius procesus, tai klostridijos, enterobakterijos, mikroskopiniai grybai, listerijos ir kt. Šie mikroorganizmai ne tik gadina pašarą, bet kartu kenkia galvijų sveikatingumui ir mažina gyvūninės produkcijos, ypač pieno, higieninę kokybę [78, 142].

Siloso kokybė priklauso nuo fermentacijos proceso, kuriame dalyvauja homofermentatyvinės pieno rūgšties bakterijos, sukeliančios substrato parūgštėjimą, slopinančios nepageidaujamų mikroorganizmų vystymąsi. Dėl silosuojamų žolių botaninės sudėties, jų brendimo tarpsnio, vytinimo laiko, nepakankamo vandenyje tirpių angliavandenių kiekio epifitinė pienarūgščių bakterijų mikroflora ne visuomet geba sumažinti silosuojamo pašaro pH iki reikiamo parūgštėjimo. Tokiu atveju, norint pagerinti fermentacijos procesą, galima į siloso žaliavą įterpti įvairių siloso inokuliantų, į kurių sudėtį įeina pienarūgštės bakterijos. Nėra atlikta pakankamai tyrimų apie silosuojamų pašarų higieninę kokybę, neįterpiant į juos priedų, gerinančių fermentacijos procesus [137, 178].

Pieno rūgšties bakterijoms priskiriamos *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ir *Leuconostoc* bakterijų gentys. Šie mikroorganizmai, fermentuodami vandenyje tirpius angliavandenius, gamina pieno rūgštį bei kitus šalutinius rūgimo produktus, kaip acto rūgštį, etanolį, anglies dvideginį. Jos priklausomai nuo susidariusių galutinių rūgimo produktų skirstomos į dvi pagrindines grupes, tai yra homofermentines ir heterofermentines. Homofermentinės bakterijos fermentuodamos angliavandenius dažniausiai gamina pieno rūgštį ir nedaug šalutinių rūgimo produktų. Heterofermentinės bakterijos, be pieno rūgšties, pagaminta labai daug šalutinių rūgimo produktų: acto rūgšties, etilo alkoholio, anglies dioksido, vandenilio. Silose aptinkamos fakultatyvinės heterofermentinės pieno rūgšties bakterijos, skaidančios heksozę ir pentozę bei obligatinės heterofermentinės – fermentuojančios heksozes į įvairius rūgimo produktus. Šių mikroorganizmų augimui ir dauginimuisi reikalingos amino rūgštys, vitaminai. Jų dominavimo silosuotuose pašaruose mechanizmas iki šiol nėra pilnai žinomas. Viena priežasčių, lemiančių jų populiaciją silosuotuose pašaruose, gebėjimas produkuoti bakteriocinus, kurie slopina kitų mikroorganizmų vystymąsi. Taip pat gaminant pieno rūgštį mažėja substrato pH, kartu slopinamas daugumos mikroorganizmų vystymasis [50, 63, 71].

Biogeniniai aminai (BA) – tai nepageidaujami, biologiškai aktyvūs junginiai, susidarantys silosuotuose pašaruose dekarboksilinant aminorūgštis. Šiame procese dalyvauja pienarūgštės bakterijos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* bei nepageidaujama mikroflora: *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Escherichia* ir *Pseudomonas* [68, 88]. Silosuotose pašaruose dažniausiai aptinkami biogeniniai aminai – putrescinas, kadaverinas, tiraminas, atitinkamai susidarę iš arginino, lizino ir tirozino. Kiti biogeniniai aminai, susidarę dekarboksilinant triptofaną, histidiną ir argininą, tokie kaip triptaminas, histaminas, spermidinas ir sperminas, aptinkami mažesnėmis koncentracijomis. Proteolizės metu, kuomet susidaro biogeniniai aminai, silosuotose pašaruose mažėja baltymų kiekis, dėl ko sumažėja ir pašaro mitybinė vertė. Nustatytas ir neigiamas BA poveikis gyvūnų sveikatingumui. Mokslininkų Lingaas ir Tveit [98] duomenimis, karvėms – gaunančioms su silosuotais pašarais 100 g putrescino per parą, išsivysto anoreksija, smarkiai sumažėja pieno primilžis. Nors hiperketonemija siejama su silose esančiu dideliu sviesto rūgšties kiekiu, tačiau didelė koncentracija putrescino ar kitų aminų pašare taip pat gali būti viena jos priežasčių. BA ženkliai sumažina siloso skonines savybes, dėl ko sumažėja sausų medžiagų ėdamumas bei produkcija [98].

Didelis biogeninių aminų kiekis aptinkamas silosuotuose pašaruose, kuriuose yra didelis baltymų kiekis (pvz.: liucernos, dobilo, kai kurių varpinių žolių). Tačiau, kadangi aminai susidaro dekarboksilinant amino rūgš-

tis, dalyvaujant ne tik puvinimo bakterijoms, bet ir pienarūgštėms, tai šių junginių galime aptikti ir kukurūzų silose [88, 152].

Mielės – tai vieni pagrindinių aerobinių mikroorganizmų, lemiančių silosotų pašarų kokybę. Šie mikroorganizmai vieni pirmųjų pradeda augti ir vystytis dėl silosotų pašarų sąlyčio su oru. Dėl šios priežasties mielės gali augti ir daugintis kuomet pH yra 3,5 ar mažiau. Tokios pačios sąlygos predisponuoja acto rūgšties bakterijų ir mikroskopinių grybų augimą, tačiau šie mikroorganizmai vystosi lėčiau nei mielės. Mielės, skaidydamos pieno rūgštį, didina siloso pH taip sudarydamos palankias sąlygas kitų nepageidaujamų mikroorganizmų vystymuisi, ypač tuomet, kai pH padidėja iki 4,5. Kai kurios mielių rūšys gali augti ir daugintis anaerobinėmis sąlygomis fermentuodamos angliavandenius į etanolį [50, 110, 118].

Listeria spp. – plačiai paplitusios bakterijos gamtoje. Jos aptinkama silose, dirvožemyje, pūvančių augalų liekanose, nuotekų vandenyse, išmatose. Žmogui ir gyvūnams patogeninės – *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* rūšys. *L. monocytogenes* – specifinis mikroorganizmas, aptinkamas nepasterizuotame piene ir jo produktuose, sukeliantis per maistą plintančią infekciją, patogeniškas žmonėms ir gyvūnams ir saprofitas mus supančioje aplinkoje [144].

Prastos kokybės fermentuotas pašaras didina listeriozės paplitimą. Kuomet karvės šeriamos pašaru su *L. monocytogenes* užkratu, šis patogeninis mikroorganizmas gali karvėms predisponuoti (sukelti) mastitą, o su pienu patekti pas galutinį vartotoją – žmogų su tokiais maisto produktais, kaip pasterizuotas pienas, pieninis šokoladas, sviestas, sūris, mėsa ir jos gaminiai. Siloso kokybė ir jo higieniniai rodikliai yra labai svarbūs, norint palaikyti tinkamą bandos sveikatingumą ir gyvūninės produkcijos kokybę. Siloso tinkama gamyba sumažina *Listeria* spp. paplitimą [160]. Atrajotojų akių infekcijos, keratitai, sukelti *L. monocytogenes*, buvo susieti su tiesioginiu patogeno patekimu per pašarus, dažniausiai per silosuosius [114]. Dėl prastų anaerobinių sąlygų, prasto žaliavos suslėgimo silosuoti pašarai yra tinkama terpė *Listeria* spp. augti ir vystytis [144].

1.2.2 lentelė. *Listeria* spp. aptikimo dažnis pieninių karvių pašaruose [89]

Pašaras	<i>Listeria</i> spp. (proc.)	<i>L. monocytogenes</i> (proc.)
Žolė (n=14)	neaptikta	neaptikta
Silosas (n=48)	4 (3,1)	6 (4,7)
Šienainis (n=16)	2 (1,5)	2 (1,5)
Šienas (n=10)	neaptikta	2 (1,5)
Koncentruotas pašaras (n=32)	neaptikta	12 (9,3)
Viso raciono pašaro mišinys (TMR) (n=4)	2 (1,5)	2 (1,5)
Šiaudai (n=6)	4 (3,1)	2 (1,5)
Iš viso (n=130):	12 (9,2)	26 (20,0)

1.2.3 lentelė. *Listeria* spp. ir *L. monocytogenes* pašaruose iš ekologinių ir įprastinės gamybos ūkių skirtingais metų laikais [89]

Metų laikas	Ekologinis ūkininkavimas			Įprastinis ūkininkavimas		
	Mėginių skaičius	<i>Listeria</i> spp., n (proc.)	<i>L. monocytogenes</i> , n (proc.)	Mėginių skaičius	<i>Listeria</i> spp., n (proc.)	<i>L. monocytogenes</i> , n (proc.)
Žiema	19	4 (7,4)	10 (18,5)	30	2 (2,6)	8 (10,5)
Pavasaris	14	2 (3,7)	2 (3,7)	14	0	0
Vasara	6	0	0	14	0	0
Ruduo	15	2 (3,7)	4 (7,4)	18	2 (2,6)	2 (2,6)
Iš viso:	54	8 (14,8)	16 (29,6)	76	4 (5,2)	10 (13,1)

Clostridium spp. dar vadinamos sviesto rūgšties bakterijomis, gali būti aptinkamos prastos kokybės silosuotose pašaruose. Tai obligatinis anaerobas, formuojantis sporas ir dujas. *Clostridium* spp. sporos su silosuotu pašaru patenka į virškinimo traktą ir išskiriamos su išmatomis. Per išmatomis užterštą tešmenį sporos melžimo metu patenką į pieną [172]. Reindl su bendraautoriais nustatė didesnę sporų skaičių pieno mėginiuose tų gyvūnų, kurie buvo šerti silosuotais pašarais, lyginat su gyvūnais, į kurių racioną silosuoti pašarai nebuvo įtraukti. Iki šiol didesnis ir dažnesnis sviesto rūgštį gaminančių bakterijų paplitimas buvo siejamas su silosuotais pašarais, pagamintais iš varpinių ir ankštinių augalų, kurie pasižymi didele buferine geba ir prastomis fermentacinėmis savybėmis [133]. Kukurūzų silose dėl jo gerų fermentacinių savybių, lyginat su kita silosuojama žaliava, šių nepageidaujamų mikroorganizmų aptinkama nedaug [118]. Tačiau Vissers su bendraautoriais nustatė, kad Niderlandų pieno ūkiuose kukurūzų silosas buvo labiau užterštas *Clostridium* spp. nei žolės silosas. Didelis *Clostridium* spp.

sporų kiekis aptiktas kukurūzų siloso viršutiniuose sluoksniuose, aerobinėje aplinkoje, mikroskopinių grybų pažeistose vietose [172].

1.3. Mikroskopinių grybų paplitimas siloso žaliavose ir silosuotuose pašaruose

Pelėsiniai grybai – filamentiniai mikroskopiniai grybai plačiai aptinkami mus supančioje aplinkoje, maistinėse ir pašarinėse žaliavose bei jų galutiniuose produktuose. Lyginant su kitais mikroorganizmais, jie pasižymi lėtesniu augimu ir vystymusi fermentuotuose substratuose. Tad supelijęs pašaras – vienas pagrindinių rodiklių, sprendžiant apie pašaro kokybę [110, 111]. Mikroskopiniai grybai skirstomi į dvi grupes: laukų ir sandėlių grybus. Laukų mikroskopiniams grybams priskiriami *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. bei daugelis kitų mikroskopinių grybų. Iš kurių galimai toksikogeninėms rūšims priskiriamos *F. graminearum*, kurios dažniausiai aptinkamos ant senų peraugusių augalų, augančių permainingomis klimato sąlygomis, taip pat *F. verticillioides*, *F. culmorum* bei kitos rūšys. Sandėlių mikroskopiniams grybams, aptinkamiems silosuotuose pašaruose, priskiriami *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Monascus ruber*, *Bysschlamys nivea* bei daugelis kitų [6, 11, 21].

Filamentiniai mikroskopiniai grybai į silosuojamą žaliavą patenka iš laukų derliaus nuėmimo metu bei transportuojant, silosuojant. Mikotoksikogeniniai mikroskopiniai grybai geba sintezuoti daugiau nei vieną toksiną tuo pat metu. Šie mikroskopiniai grybai aptinkami plačiai aplinkoje ir gali būti, kaip pavyzdžiui, *Fusarium* spp. augalų patogenas ir/ar endofitas, tuo tarpu *Alternaria* spp. yra epifitinis saprofitas ar silpnas patogenas. Dažniausiai šios gentys mikotoksinus produkuoja laukuose, esant tam tinkamoms sąlygoms. Pašarų sandėliavimo metu dažniausiai aptinkamos *Aspergillus* ir *Penicillium* rūšys, todėl ir jų toksinų gamyba siejama su šiuo laikotarpiu. Tačiau tam tikros palankios klimatinės sąlygos, tokios kaip aukšta temperatūra, sausas oras, vabzdžių invazija, gali daryti įtaką šių mikroskopinių grybų rūšių toksinų gamybai ir laukuose. *Fusarium* ir *Alternaria* rūšys taip pat gali būti aptinkamos ir silosuotose pašaruose esant žemam deguonies kiekiui [105, 20, 11]. Mikotoksinių biosintezę gali nulemti ir specifiniai genai. Buvo nustatyta, kad kai kurių mikroskopinių grybų rūšių gentys gali produkuoti ir neprodukuoti toksinų, kaip pavyzdžiui, *Fusarium* spp. gentys *F. graminearum* ir *F. culmorum* geba produkuoti B trichotecenus, tokius kaip deoksini-valenolį (DON), acetildeoksinivalenolį, o kitos gentys šių toksinų neprodukuoja. Šie du tipai *Fusarium* rūšies mikroskopinių grybų (produkuojantys ir neprodukuojantys) gali būti dėl genominės DNR polimorfizmo [14, 134].

Galimai toksikogeninių mikroskopinių grybų *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., aptiktų silosuotose pašaruose, nustatymas galimas išskiriant ir įvertinat grynas kultūras makroskopiškai ar mikroskopuojant. Tačiau morfologinė analizė užima daug laiko, nes tam reikalingas atskirų kultūrų išskyrimas ir išgryninimas, norint identifikuoti kiekvieną mikroskopinių grybų gentį iki rūšių [134]. Todėl vis dažniau ir plačiau taikomi greitesni ir tikslesni molekuliniai metodai mikotoksikogeniniams mikroskopiniams grybams aptikti. Vienas tokių metodų – polimerazės grandininė reakcija (PGR) – gali būti taikoma šiems mikroorganizmams aptikti ir identifikuoti. Šiuo metodu, naudojant pradmenis *ver-1*, *omt-1*, *apa-2*, identifikuoti aflatoksikogeniniai mikroskopiniai grybai grūduose, tiesiogiai lemia aflatoksinų biosintezę. Mikroskopiniams grybams, lemiantiems fumonizinių ir trichotecenų sintezę, identifikuoti buvo susintetinti pradmenys, t. y. genų, tiesiogiai dalyvaujančių mikotoksinų biosintezėje: FUM1 – fumonizinių, o TRI5, TRI6, TRI7 – trichotecenų sintezėje [22, 127, 134, 143].

Veiksniai, lemiantys mikroskopinių grybų vystymąsi ir mikotoksinų gamybą

Mikroskopiniai grybai silosuotuose pašaruose sukelia sausųjų medžiagų nuostolius, pašaro perkaitimą, suprastėja pašaro mitybinė vertė. Augant ir vystantis šiems mikroorganizmams, kinta pašaro organoleptinės savybės, tai yra spalva, konsistencija, kvapas, dėl ko suprastėja pašaro skonio savybės, sumažėja pašarų suvartojimas. Taip pat mikroskopinių grybų antriniai metabolitai, dėl sinergistinio ar papildomo poveikio patekę su pašaru į gyvulio organizmą, gali sukelti sveikatos sutrikimų [107, 173]. Mikroskopiniai grybai į silosuotus pašarus patenka per dirvožemį derliaus nuėmimo ar netinkamo laikymo metu. Fermentacijos metu, vykstant substrato parūgštinimui, dehidracijai ir susidarius anaerobinėms sąlygoms, stabdomas šios mikrofloros augimas ir vystymasis. Nustatytas teigiamas ryšys tarp laisvojo vandens aktyvumo (a_w) pašaruose ir mikroskopinių grybų skaičiaus. Tinkamas vandens aktyvumas silose sandėliavimo metu – 0,7–0,8. Kai jis padidėja, suaktyvėja *Eurotium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. ir kitų mikroskopinių grybų, kurie daro įtaką pašaro kaitimui ir termofilinių mikroskopinių grybų aktyvumui, vystymasis [76, 103]. Alonso su bendraautoriais nustatė, kad siloso užterštumas mikroskopiniais grybais padidėja, kuomet pašaro $a_w > 0,93$, taip pat didesnis *Aspergillus* spp. ir *A. flavus* kiekis nustatytas, kai siloso pH > 4,5 [6].

Pagal Driehuis ir jo bendraautorius, mikroskopinių grybų augimas silosuotose pašaruose atsiranda dėl deguonies poveikio. Silosuoto pašaro žaliajoje dažniausiai aptinkama *Fusarium* spp. rūšių produkuojami mikotoksi-

nai: DON, zearalenonas (ZEA), T2/HT2 toksinai, nivalenolis (NIV), fumonizinais (FB), fusario rūgštis (FA), beauvericinas (BEA) ir *Alternaria* spp. Toksinai – alternariolis (AOH), alternariolio monometilo eteris (AME) [51, 52]. Pagrindiniai ir dažniausiai aptinkami mikotoksinai kukurūzų silose yra DON ir ZEA [145]. Su koservuotais pašarais ir kukurūzų silosu į gyvulio organizmą patenka 56,0 proc ir 51,0 proc. DON ir ZEA visų mikotoksinų patenkančių su pašaru per visą dienos racioną [159].

1.3.1 lentelė. Siloso žaliavoje ir pašaruose dažniausiai aptinkami mikroskopiniai grybai bei mikotoksinai ir jų toksinis poveikis [41]

Mikroskopiniai grybai	Mikotoksinai	Toksinis poveikis
Prieš derliaus nuėmimą		
<i>Alternaria</i> spp.	Alternariolis, alternariolis monometil eteris, tenuazoninė rūgštis, altenuenas	Fitotoksinis, citotoksinis, fetotoksinis, teratogeninis, mutageninis, genotoksinis
<i>Fusarium avenaceum</i>	Beauvericinas	DNR pažeida, kardiotoksiškumas
<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Deoksinivalenolis	Sumažėjęs apetitas, viduriavimas, vėmimas, reprodukcijos sutrikimai
<i>F. avenaceum</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. compactum</i>	Enniatinas	Toksiškumas žinduolių ląstelėms
<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Fumonizinais	Hepatotoksinis, nefrotoksinis
<i>F. venenatum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. sambucinum</i>	T-2 toksinas	Hemoraginis, reprodukcijos sutrikimai
<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i>	Zearelenonas	Estrogeninis
Po derliaus nuėmimo		
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Aflatoksinai	Karcinogeninis, hepatotoksinis, DNR pažeidimai
<i>Penicillium</i> spp.	Andrastinas A, B, C	Inhibitorinis priešvėžinis faktorius
<i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Monascus ruber</i>	Citrininas	Nefrotoksinis, embriotoksinis
<i>A. versicolor</i> , <i>A. cyclopium</i>	Ciklopiazoninė rūgštis	Vazodilatatorius, neurotoksinis endoplazminio tinklo inhibitorius
<i>A. fumigatus</i>	Fumigaklavinas A, C, fumitremorgenas	Hemoraginis, diarėja, tremoras

1.3.1 lentelės tęsinys

Mikroskopiniai grybai	Mikotoksinai	Toksinis poveikis
<i>A. fumigatus</i>	Gliotoksinas	Hematurija, antivirusinis, antigrybinis, antibakterinis, imunosupresinis
<i>P. brevicompactum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. carneum</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	Mikofenolio rūgštis	Imunosupresinis, antivirusinis, antigrybinis, antibakterinis, priešvėžinis
<i>Monascus ruber</i> , <i>A. terreus</i>	Mevinolinas (Monakolinas)	Hipocholesteroleminis
<i>A. ochraceus</i> , <i>P. verrucosum</i>	Ochratoksinas A	Karcinogeninis, nefrotoksininis, teratogeninis, imunosupresinis
<i>P. expansum</i> , <i>B. nivea</i>	Patulinas	Karcinogeninis, plaučių edema, hemoragijos
<i>P. roqueforti</i>	PR toksinas	Kepenų ir inkstų pažeidimai, mutageninis
<i>P. roqueforti</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i>	Rokuefortinas A, B, C	Neurotoksinis
<i>A. versicolor</i> , <i>A. nidulans</i>	Sterigmatocistinas	Hepatotoksinis, karcinogeninis, teratogeninis
<i>A. fumigatus</i>	Verrukulogenas	Tremoras

Žiūrint iš ūkio valdymo perspektyvų, siloso tranšėjos atidarymas gyvulių šėrimui, yra svarbus etapas, kurio metu gali suintensyvėti mikroskopinių grybų augimas bei mikotoksinų gamyba. Kaip minėta anksčiau, mikroskopiniai grybai į silosuoatą pašarą patenka su silosuojuama žaliava. Anaerobinių procesų metu aerofilinių mikroorganizmų veikla slopinama. Tačiau atidarius siloso tranšėją gyvulių šėrimui, atmosferinis deguonis suaktyvina mikroorganizmus, tarp jų mikroskopinius grybus (sporas išlikusias fermentacijos metu) ir mieles, kurie besivystydami sukelia maistinių medžiagų nuostolius, aerobinį gedimą [118, 119, 177, 178]. Jeigu siloso tranšėjos pjūvis turi sąlytį su atmosferiniu deguonimi keletą dienų, tai pakankamas laikas mikroorganizmų vystymuisi bei mikotoksinų produkavimui. Kitos priežastys, darančios įtaką aerobiniam gedimui atidarius siloso tranšėją šėrimui, yra drėgnis. Hargreaves su bendraautoriais (2009) nustatė, kad silosuojuant pašarus, kurių drėgnis yra vidutinis/aukštas (apie 350 g SM/kg), pieno rūgštis aerobinėse sąlygose transformuojama į sviesto rūgštį, kuri slopinančiai veikia mikroskopinius grybus ir mieles. Kai silosuojuamas pašaras su dideliu SM kiekiu (450 g SM/kg), šis procesas yra lėtesnis [75]. Aerobinis gedimas vyksta lėčiau, kai silose yra didesnis kiekis sviesto rūgšties. Autoriai taip pat

pabrėžia substrato (siloso) temperatūros svarbą, siloso suslėgimą, tinkamą uždengimą [23, 24, 52, 75]. Skirtinga silosavimo technologija, skirtinga ruošimo technika, laikymo sąlygos, gali daryti įtaką siloso cheminiam ir fermentaciniam procesams bei užterštumui nepageidaujamais mikroorganizmais [38]. Gonzales Pereira su bendraautoriais palygino kukurūzų siloso, sudėto į tranšėjas ir į ritinius, užterštumą mikroskopiniais grybais ir mikotoksinais. Autoriai nustatė didesnę užterštumą *Aspergillus* spp. ir *Fusarium* spp. kukurūzų siloso, sudėto į tranšėjas, o *Penicillium* spp. – ritiniuose. Didesnė aflatoksinų B₁ koncentracija (AFB₁) nustatyta ritiniuose. Taip pat didesnis šių nepageidaujamų mikroorganizmų kiekis nustatytas siloso mėginiuose, paimtuose iš siloso ritinių su pažeista plėvele [120].

1.4. Mikotoksinų paplitimas siloso žaliavose ir silosuotuose pašaruose

Mikroskopinių grybų gentys geba produkuoti tam tikrus antrinius metabolitus priklausomai nuo substrato, aplinkos sąlygų. Laukuose prieš derliaus nuėmimą pašaro žaliava gali būti užteršta šių mikroskopinių grybų *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, priskiriamų „*laukų gybams*“ antriniais metabolitais: aflatoksinu B₁, alternarioliu, alternariolio monometilo eteriu, beauvericinu, deoksinivalenoliu, 15-acetil-deoksinivalenoliu, enniatinu B ir B₁, fumonizinu B₁, nivalenoliu, zearalenonu. Silosas dėl pasikeitusių aplinkos sąlygų po fermentacijos gali būti užterštas *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Monascus* spp., *Byssoschlamys* spp. ir kitų mikroskopinių grybų antriniais metabolitais, tokiais kaip andrastinas A, citreoisokumarinas, citrininas, ciklopiazoninė rūgštis, fumigaklavinas A, gliotoksinas, markfortinas A ir B, mikofenolinė rūgštis, patulinas, PR-toksinas, rokuefortinas A ir C. Daugelis šių metabolitų – tai mikotoksinai, pasižymintys ūmiu toksiniu poveikiu žmogaus ar gyvūno organizmui (1.4.1 lentelė). *A.fumigatus* dažniausiai aptinkama mikroskopinių grybų rūšis silosuotose pašaruose, gebanti produkuoti mikotoksinus, tokius kaip gliotoksinas, fumitremorgenas B ir C, fumigaklavinas C ir B, kurie gali sukelti abortus ar slopinti imuninę sistemą [33, 120, 121].

1.4.1 lentelė. Mikotoksinų poveikis atrajotojams [167]

Mikotoksinas	Koncentracija	Toksikozės simptomai
Aflatoksinai (bendrai)	600 µg/kg (kastruoti buliukai, galvijų prieauglis)	Sumažėja pašaro įsisavinimas, priesvorio sumažėjimas
	200–800 µg/kg	Didžiojo prieskrandžio susitraukimų suretėjimas
	2500 µg/kg pašare (ėriukai) po 21 dienos	Kepenų, inkstų pakitimai, šių organų masės padidėjimas
	10–108,5 µg/kg pašare (galvijai)	Sumažėja pašaro įsisavinimas ir priesvoriai
	2500 µg/kg pašare (5 mėn. amž. ėriukai)	Žymus priesvorio sumažėjimas, sumažėjęs ląstelinis imunitetas
Ochratoksinai (bendrai) (OT)	390–540 µg/kg miežiuose (12 sav. amž. veršeliai)	Klinikiniai simptomai nepasireiškė
	2000–5000 µg/kg (avys)	Klinikiniai simptomai nepasireiškė; OT neaptikta po 1 val. inkubacijos
	100–150 µg/kg ožkos rumen turinys (<i>in vitro</i>)	OT neaptikta po 6 val. inkubacijos
Zearalenonas	385–1925 µg/kg pašaruose (laktacijos metu)	Nestebimi pakitimai pieno produkcijos kiekyje ir kokybėje
	12000 µg/kg pašaruose (avys)	Neigiami pakitimai reprodukciniame sistemoje
	12000 µg/kg pašaruose (galvijai)	Klinikiniai simptomai nepasireiškė
Deoksinivalenolis ir T-2 toksinas	15 600 µg/kg DON (avys)	Priesvorio sumažėjimas
	10 000–20 000 µg/kg T-2 pašaruose (veršeliai)	Papilių nekrozė ir opos <i>omasum</i>
	3 000–5 000 µg/kg (pieniniai galvijai)	Sumažėjo IgA, albuminų ir globulinų kraujo serume

Mikotoksinai ekologinių ūkių pašaruose

Ekologinis ūkininkavimas, apibrėžtas Europos Komisijos reglamentu (EB) Nr. 1991/2006 (A), iš dalies keičiantis Reglamentą (EEK) 2092/91, smarkiai išaugo per pastaruosius du dešimtmečius (EK, 2013). Remiantis Lietuvos statistikos departamento duomenimis, 2015 metais ūkių skaičius Lietuvoje – 2866, t. y. 9 proc. daugiau nei 2012 metais. O ekologinio ūkininkavimo plotai nuo 2012 metų iki 2015 metų padidėjo 36,40 proc. [59, 100].

Ekologinėje žemdirbystėje draudžiami cheminiai fungicidai, dėl to yra manoma, kad šiuose ūkiuose užaugintoje produkcijoje bus didesnė ir mikotoksinų koncentracija. Tačiau įvairių tyrimų duomenimis nustatyta, kad mikotoksinų koncentracija ekologiniuose ūkiuose užaugintuose pašaruose ar jų žaliavoje yra tokia pati ar net mažesnė nei įprastinės gamybos ūkiuose [95]. 2009–2012 metais Lenkijoje buvo nustatytos ir palygintos mikotoksinų koncentracijos rugiuose iš ekologinių ir įprastinės gamybos ūkių, šių tyrimų metu didžiausia 254 ± 23 $\mu\text{g/kg}$ nustatyta DON koncentracija ir T-2/H-2 koncentracija rugiuose iš įprastinės gamybos ūkių, o ZEA iš ekologinių ūkių [31].

Ekologiniuose ūkiuose esantis žemas azoto lygis gali būti viena to priežasčių. Taip pat nustatytas didesnis nepatogeninių *Fusarium* spp. genčių kiekis ekologiniuose ūkiuose, kurie yra antagonistai *F. culmorum* mikroskopiniams grybams. *Fusarium* spp. genties mikroskopinių grybų sintezuojamo mikotoksino DON ekologiniuose ūkiuose užaugintuose grūduose nustatytas toks pats kiekis ar net žemesnis nei įprastinės gamybos ūkiuose. Birzele su bendraautorais atliktų tyrimų metu taip pat pastebėta teigiama koreliacija tarp azoto lygio dirvožemyje ir *Fusarium* spp. kiekio. Žemas azoto lygis dirvožemyje didina konkurenciją tarp nepatogeninių *Fusarium* spp. ir patogeninių, gebančių sintezuoti mikotoksinus [20, 27].

1.5. Mikotoksinų poveikis galvijų organizmui

Atrajotojų racioną sudaro krakmolo ir baltymų turtingi koncentruoti pašarai, jų šalutiniai produktai, taip pat stambieji pašarai, tokie kaip šienas ir šiaudai, sultingieji pašarai, kuriems priskiriami žalieji pašarai, silosas, šienainis [16]. Pastarieji laikomi įvairių toksinų šaltiniu atrajotojų pašaruose. Naujausių tyrimų duomenimis, didžiausias mikotoksinų kiekis, patenkantis į karvių organizmą, siejamas su jų koncentracijomis sultinguose pašaruose. Nors mokslinių tyrimų apie mikotoksinų ir jų producentų paplitimą silosuotose pašaruose ir jų žaliavoje yra labai nedaug, lyginat su koncentruotais pašarais [153].

Atrajotojai dėl didžiojo prieskrandžio mikrofloros mažiau jautrūs toksinų poveikiui nei vienkamerinį skrandį turintys gyvūnai. Tačiau šis poveikis priklauso nuo daugelio veiksnių, tokių kaip gyvūnų rūšis, lytis, amžius, mitybos racionas, aplinkos sąlygos, higiena, pašare esančių mikotoksinų kiekio, jų koncentracijos, toksinų sinergistinio ar antagonistinio tarpusavio ryšio, taip pat labai svarbu – kiek laiko gyvūnas šeriamas mikotoksinais užterštu pašaru [179].

Mikoestrogenas ZEA atrajotojų didžiajame prieskrandyje skaidomas į α -zearalenolį ir β -zearalenolį. Pirmasis junginys pasižymi didesniu estroge-

niniu poveikiu nei β -zearalenolis, tačiau jis yra absorbuojamas kepenyse ir verčiamas į β -zearalenolio junginį. Kiaulės, ypač jaunos kiaulaitės, yra jautriausios ZEA, jis joms gali sukelti kiaušidžių atrofiją, užsitęsusių rujų, persistuojantį geltonąjį kūną, sumažėjusį apsivaisinimą, abortus [61].

Naujausių tyrimų duomenimis, nustačius zearalenono kiekį galvijų šlapime, galima įvertinti šių toksinų kiekį pašaruose ir poveikį galvijams. Vienas pagrindinių faktorių, lemiančių gyvūnų jautrumą mikotoksinų poveikiui, yra pačio organizmo gebėjimas eliminuoti ir neabsorbuoti šių junginių. Pavyzdžiui, atrajotojai dėl prieskrandžių mikrofloros veiklos, kuri skaido ir inaktyvuoja daugelį cheminių junginių, taip pat ir mikotoksinus, mažiau jautrūs mikotoksinų žalingam poveikiui nei gyvūnai su vienkamerinio skrandžio sistema. Tačiau dėl savo skirtingos cheminės struktūros mikotoksinais skaidomi ir eliminuojami skirtingai. Pavyzdžiui, fumonizinais yra skaidomi sunkiau nei aflatoksinai, trichotecenai, ochratoksinai. Nuolatos nedidelėmis dozėmis su pašaru mikotoksinais patenkantį atrajotojų organizmą, vystosi prieskrandžių acidozė, priesvorio sumažėjimas, stebima laminitų, mastitų klinika. Ypatingai neigiamą antimokrobinį poveikį daro į organizmą patekę *Penicillium* genties (pvz., *P. roqueforti*) išskiriami mikotoksinais [17, 65, 179].

Dideli mikotoksinų kiekiai koncentruotuose pašaruose yra sunkiau nukenksminami, nes padidėja jų rezorbcija gyvulio organizme. Ši hipotezė paremta stebėjimais, atliktais su melžiamomis karvėmis fermose. Tyrimo metu pastebėtas sumažėjęs dienos primilžis ir padidėjęs galvijų sergamumas infekcinėmis ligomis, apsinuodijimai silosu, kuris buvo užterštas mikroskopiniais grybais ir didelėmis mikotoksinų DON ir ZEA koncentracijomis. Taip pat žymūs metabolitų ir hormonų pasikeitimai pastebimi karvių organizme, nes karvės pereinamuoju laikotarpiu yra jautrios pašarui, užterštu mikotoksinais [29, 62].

Atrajotojų klinikinės mikotoksikozės siejamos su toksinais, patenkančiais su pašaru į galvijo prieskrandžius, kuriuose šie junginiai neskaidomi ar skyla tik dalinai. Šiems toksinams priskiriami alkaloidai, laktonai, kumarinai, taip pat karbocikliniai esteriai [62, 167].

Gliotoksinas – epipolitiodioksi piperazino grupės priskiriamas mikotoksinas. Žmonėms ir gyvūnams sukeliantis mikotoksikozes ir aspergiliozes. Tyrimuose *in vitro*, nustatyta, kad šis toksinas slopina antigeno, kuris sužadina limfocitus, aktyvaciją bei T ląstelių aktyvaciją, ir gama interferono gamybą. Taip pat didelės gliotoksino koncentracijos sukelia makrofagų ir limfocitų apoptozę dėl DNR pažeidimo ir aduktorių susidarymo [116].

***Fusarium*, *Aspergillus* ir *Penicillium* genčių produkujamų mikotoksinų poveikis organizmui**

Fusarium genties mikroskopiniai grybai produkuoja mikotoksinius, kurie suskirstyti į tris grupes: trichotecenus, fumonizinus ir zearalenoną. Šie junginiai yra santykinai mažo toksiškumo, tačiau sukeliantys lėtinius organų ir audinių pažeidimus, svorio sumažėjimą, imuniteto slopinimą ir reprodukcijos sutrikimus [60, 164]. *Fusarium* mikotoksinai yra antri pagal svarbą po aflatoksinų dėl sukeliamų ekonominių nuostolių žemės ūkyje ir toksiškumo.

Trichotecenai – grupė mikotoksinų, kuriuos sintetuoja daugelis *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* mikroskopinių grybų rūšių. Genai, atsakingi už trichotecenų sintezę, buvo klonuoti ir plačiai tyrinėjami [43]. Šiuo metu yra nustatyta daugiau nei 120 trichotecenų [135]. Trichotecenai, patekę į organizmą, jungiasi prie 60S ribosomos subvieneto ir sutrikdo baltymų sintezę eukariotinėse ląstelėse. Genai, atsakingi už šių mikotoksinų biosintezę, jų cheminę struktūrą yra tyrinėjami iki šiol [1, 2, 19].

DON – labiausiai paplitęs ir geriausiai ištirtas B grupės trichotecenas, kurį dažniausiai sintetuoja *F. culmorum*, *F. graminearum* rūšys. DON labiau jautrūs vienkamerinį skrandį turintys gyvūnai, ypač kiaulės. Paukščiams toksinis poveikis pasireiškia, kai DON koncentracija pašare – 16-20 mg/kg. Atrajotojai dėl prieskrandžių mikrofloros mažiausiai jautrūs DON toksiniam poveikiui. Pagal Wilkinson deoksinivalenolis – vienas dažniausiai aptinkamų mikotoksinų silosuotose pašaruose [178, 179].

Apsinuodijus DON, ūmus poveikis pasireiškia pilvo skausmais, galvos svaigimu, skausmu, pykinimu, vėmimu, viduriavimu, krauju išmatose dėl sukkelto uždegimo žarnyne. DON, patekęs į organizmą, didina citokinų kiekį slopindamas imuninę sistemą ir suaktyvina apoptozės mediatorių kaspazę-3. Taip pat sukelia oksidacinį stresą dėl DNR pažeidimo [122, 125, 168]. DON, patekęs į ląstelę, jungiasi prie ribosomų, perduodamas signalą RNR – aktyvuotai baltymų kinazei (PKR) ir hemopoetinei ląstelių kinazei (HcK) [122].

Zearalenoną (6-(10-hidroksi-6-okso-*trans*-1-undecenyl) – β -rezorciklinis makrolaktonas) Baldwinas su bendraautoriais išskyrė iš mikroskopinio grybo *Gibberella zeae* (*F. graminearum*). Šis junginys pasižymi keliomis biologinėmis savybėmis, viena svarbiausia jų – estrogenų agonistas, gebantis jungtis prie estrogenų receptorių, kita savybė – anabolinis aktyvumas. 2010 m. Banjerdpongch su bendraautoriais nustatė silpną citotoksinį ZEA poveikį žmogaus leukemijos ląstelėms HL-60, kai IC₅₀ pasiekta, 138,21 μ mol. ir kad ZEA sukelia šių ląstelių apoptozę dėl endoplasminio streso ir mitochondrijų pažeidimų [158]. Nustatytas genotoksinis poveikis *in vitro*, sukeliantis DNR aduktų formavimąsi galvijų limfocituose [99]. DNR frag-

mentaciją, mikrobranduolių susidarymą žmogaus liežuvio epitelio ląstelėse (DOK), beždžionės inkstų ląstelėse (Vero), žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos (Caco-2), pelių kaulų čiulpų ląstelėse [3]. ZEA nesukėlė mutacijų *Salmonella typhimurium* ląstelėse ir mitozinio krosingoverio *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse. Kinijos žiurkėno kiaušidžių ląstelėse *in vitro* nustatyti seserinių chromatidžių mainai, chromosomų aberacijos, poliploidija dėl ZEA.

Hiperestrogeninis poveikis gyvūnams pasireiškia sumažėjusia pieno gamyba, reprodukcijos sutrikimais. ZEA 14 mg/kg sukelia nevaisingumą dėl patinų lytinių ląstelių apoptozės, taip pat slopinamas ovocitų brendimas su stebimais pakitimais chromosomose. Padidėjęs 17 β -estradiolio kiekis, tai pat siejamas su ZEA [32].

Mokslininkų Stadnik ir Borzęcki atliktuose tyrimuose pastebėtas zearalenono hepatotoksinis poveikis žiurkėms, kurios 10 dienų buvo šertos pašaru su skirtingomis zearalenono koncentracijomis (50, 100, 200, 500 μ g kūno svorio). Padidėjo jų kepenų fermentų aminotransferazės (ALT ir AST) rodikliai. Įvertinus žiurkių kraujo tyrimus po 24 val., kepenų fermentų rodikliai nebuvo pakitę [151].

Charmeley su bendraautoriais atliktuose tyrimuose nustatyta, kad DON koncentracijos 0, 600, 1200 μ g/kg pašaro koreliuoja su riebalų kiekiu piene [37]. Kitų mokslininkų atliktuose tyrimuose pastebėta, kad pašaruose esant 640 μ g/kg DON koncentracijai sumažėja gyvulių apetitas [163]. Taip pat nustatyta, kad, šeriant karves *Fusarium* mikotoksinais užterštais pašarais, silpnėja jų imuninė sistema, pakinta medžiagų apykaitos rodikliai [90].

Galvijų didžiojo prieskrandžio mikroorganizmai AFB₁ verčia į aflatoksiną M₁ (AFM₁), kuris išsiskiria su pienu. AFM₁ koncentracija piene priklauso nuo AFB₁ koncentracijos pašaruose. Ūmi galvijų aflatoksikozė gali pasireikšti anoreksija, pieno primilžio sumažėjimu, kepenų pakitimais. Modelinėse sistemose *in vivo* ir *in vitro* nustatyta, kad AFB₁ atrajotojų prieskrandžiuose sumažina celiuliozės skaidymą ir gamybą LRR, NH₃, AFB₁ labiausiai pasižymi stipriu neigiamu poveikiu imuninės sistemos formavimuisi trikdydamas jo veiklą, tačiau nedideli kiekiai gali veikti ir kaip imunostimuliatoriai [82, 83].

Imunosupresiniu poveikiu pasižymi ir ochratoksinas A (OTA), kuris pasireiškia imuninių organų sumažėjimu, tokių kaip čiobrialiaukė, blužnis, limfiniai mazgai, taip pat antikūninio atsako sumažėjimu, imuninių ląstelių skaičiaus ir jų funkcijos pokyčiais. OTA imunotoksinė veikla susidaro dėl ląstelių degeneracinių pokyčių ir mirties, dėl nekrozės ir apoptozės bei imuninių ląstelių baltymų sintezės slopinimo [5]. Ochratoksinas A pasižymi genotoksinio ir kancerogeninio poveikiu [123]. Šis toksinas galvijams gali sukelti poliuriją, depresiją bei priesvorių sumažėjimą [155].

1.6. Priemonės, mažinančios mikotoksinų koncentracijas ir mikroskopinių grybų vystymąsi silosuotuose pašaruose

Siloso kokybei pagerinti daugelyje pasaulio šalių yra naudojami silosavimo priedai, kurie pagerina siloso fermentaciją, jo higieninę kokybę, išsaugo pašare daugiau vertingų maisto medžiagų, taip padidinant gyvūnų produktyvumą. Cheminiai priedai pagerina fermentacijos procesą ir stabdo nepageidaujamų mikroorganizmų (mielių ir mikroskopinių grybų), gadinančių pašarą, vystymąsi. Jie dažniausiai sudaryti iš organinių rūgščių ar jų druskų mišinių. Biologiniai priedai (inokuliantai) paspartina fermentacijos eigą ir nukreipia ją tinkama linkme, taip mažindami pašaro fermentacijos (sausųjų medžiagų) nuostolius ir gerindami siloso maistinę vertę. Inokuliantus sudaro gyvos pieno rūgštį produkujančios bakterijos, todėl jie gali būti sandėliuojami ir naudojami ribotą laiką [80, 142].

Organinės rūgštys didinančios aerobinį stabilumą, tai acto rūgštis, propiono rūgštis, forminė rūgštis, benzoinė rūgštis, citrinos rūgštis ir kitos jų druskos, neorganinės rūgštys (fosforo rūgštis) ir jų druskos (natrio bikarbonatas). Organinių rūgščių ir jų druskų efektyvumas priklauso nuo tirpumo vandenyje: mažesnis tirpumas vandenyje – mažesnis slopinantis poveikis mikroskopinių grybų augimui. Cheminiai priedai yra efektyvesni už biologinius, kurių veiksmingumas priklauso nuo substrato, vandens aktyvumo, tolygaus pasiskirstymo substrate bei esančios epifitinės mikrofloros [110, 111].

Pieno rūgšties bakterijos, gamindamos organines rūgštis, sukeldamos konkurencinę aplinką, dėl maistinių medžiagų, mažindamos substrato pH, slopina mikroskopinių grybų augimą bei mikotoksinų gamybą. *Lactobacillus* spp. pasižymi antigrybiniu poveikiu, t. y. *L. plantarum* 21B nustatytas stiprus antigrybinis poveikis prieš *P. roqueforti*, *A. niger*, *A. flavus*, *F. graminearum* mikroskopinius grybus, o *L. coryniformis* porūšis *coryniformis* Si3, išskirtas iš žolės siloso, slopinamai veikė *A. fumigatus*, *P. roqueforti*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum* ir *F. sporotrichioides* augimą. *Lactobacillus casei pseudoplantarum*, išskirta iš siloso, slopino AFB₁ ir aflatoksino G₁ mikotoksinų biosintezę *in vitro* [6,48]. Tačiau mokslininkai Luchese ir Harrigan atliktuose tyrimuose nustatė, kad kultivuojant *Lactococcus lactis* ir *A. parasiticus* viename substrate, labiau padidėjo aflatoksino kiekis, nei kultivuojant *A. parasiticus* atskirai. Tad galima daryti išvadą, kad pieno rūgšties bakterijos, naudojamos kaip inokuliantas silosuojamame substrate, slopinant mikroskopinių grybų augimą ir mikotoksinų sintezę, ne visuomet bus veiksmingos ir duos norimą rezultatą [174].

Nustatyta, kad mikroskopinių grybų micelio augimą gali slopinti kai kurios *Bacillus* rūšys. Viena jų yra *B. subtilis*, kuri slopinamai veikė *P. roqueforti* ir *F. verticillioiodes* konidijasporų vystymąsi *in vitro* [33].

Mielės taip pat pasižymi antagonistiniu poveikiu prieš mikroskopinius grybus. Mielių rūšys, tokios kaip *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* ir *Saccharomyces cerevisiae*, gali būti naudojamos kaip biokontrolė prieš mikroskopinius grybus didelio drėgnio kukurūzų grūdainyje. Mielių antigrybinis poveikis pasireiškia dėl jų sukeliamos konkurencinės aplinkos bei išskiriamų fermentų, pažeidžiančių mikroskopinių grybų senelę. Kai kurios mielių gentys gali produkuoti „baltymus žudikus“, kurie slopinamai veikia mielių padermes, sukeliančias siloso gedimą, taip apsaugant silosą nuo aerobinio gedimo bei tolimesnio mikroskopinių grybų augimo silose [53].

Vaistinių-prieskoninių augalų panaudojimas, gerinant silosuočių pašarų higieninę kokybę

Vaistiniai-prieskoniniai augalai, jų ekstraktai ir eteriniai aliejai nuo seno naudojami liaudies medicinoje. Tačiau jų panaudojimo galimybės yra pilnai neištytos. Sintetiniai fungicidai yra griežtai draudžiami sertifikuotose ekologiniuose ūkiuose, todėl reikalinga alternatyvių veiksmingų priemonių paieška, leidžianti kontroliuoti ar sumažinti galimą mikrobiologinę taršą ir daromą žalą. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad augalų ekstraktai ir eteriniai aliejai dėl savo sudėtyje turimų biologiškai aktyvių junginių pasižymi antimikrobiniu poveikiu [13, 46]. Čiobrelių ir raudonėlių eteriniai aliejai veikia ne tik antimikrobiškai, bet ir slopina mikroskopinių grybų augimą [28, 138, 157]. Literatūros šaltiniuose teigiama, kad šiuose eteriniuose aliejuose randami junginiai timolis ir karvakrolis efektyviausiai veikia prieš mikroskopinius grybus [92]. Svogūno, citrinos, ciberžolės, mėtos, raudonėlio, čiobrelio, imbiero, jūros dumblių ekstraktai ir eteriniai aliejai slopina mikroskopinių grybų vystymąsi ir mikotoksinų sintezę. Tačiau tam reikalingos ir tinkamos fizinės sąlygos, tokios kaip žemas pH, žema temperatūra, mažas deguonies kiekis [174].

Fenolinių junginių antibakterinis poveikis pasireiškia tuo, kad yra pažeidžiama ląstelės membrana, pakeičiant jų struktūrą ir funkcijas. Pažeidus mikroorganizmų ląstelių sienelę, jie tampa jautresni rūgštinei aplinkai [97]. Esant žemam (rūgštiniam) pH, fenolio junginiai disocijuojasi (skaidosi), tampa hidrofobiški, dėl ko lengviau geba prasiskverbti į hidrofobines membranos dalis [72]. Dimitrievič ir kt. nustatė, kad augalai *Thymus vulgaris* ir *Rosmarinus officinalis* pasižymėjo geresniu antibakteriniu poveikiu, kai buvo naudoti kartu su pieno rūgštimi. Pieno rūgšties bakterijos dažnai naudojamos kaip inokuliantai, gerinantys siloso fermentacines savybes. Įvairūs

vaistinių ir prieskoninių augalų ekstraktai gali daryti įtaką pienarūgščių bakterijų augimui ir vystymuisi fermentacinių procesų metu [45]. Elgayyar su bendrautoriais atliktų tyrimų metu nustatyta, kad raudonėlio ir kardamono eteriniai aliejai slopino *Lactobacillus plantarum*, tačiau šventgaršvės ir baziliko eteriniai aliejai tokiu poveikiu nepasižymėjo. Kmyną eterinis aliejus skatino *L. plantarum* augimą ir rūgščių gamybą [58, 149].

1.7. Mikotoksinus detoksikuojančios priemonės ir medžiagos

Kai silosavimo metu dėl kurių nors priežasčių nepavyksta nuslopinti ir sumažinti mikroskopinių grybų veiklos bei mikotoksinų susidarymo, norint apsaugoti gyvulius nuo šių sveikatai pavojingų toksinų junginių, į pašarą galima įterpti mikotoksinus detoksikuojančių medžiagų [174].

Pagal Komisijos Reglamentą (EB) Nr 386/2009 nustatyta nauja pašarų priedų funkcinė grupė: „medžiagos mažinančios pašarų kontaminaciją mikotoksinais, medžiagos galinčios stabdyti ar sumažinti absorbciją, skatinti mikotoksinų išsiskyrimą ar pakeisti jų veikimo principą“. Priklausomai nuo šių medžiagų veikimo principo, pašarų priedai gali sumažinti mikotoksinų įsisavinimą (*bioavailability*) ar transformuoti juos į mažiau pavojingus junginius. Pagal tai mikotoksinus detoksikuojantys pašarų priedai gali būti suskirstyti į dvi pagrindines grupes: adsorbuojančias medžiagas ir biotransformuojančias medžiagas. Adsorbuojančios medžiagos dar gali būti vadinamos adsorbentais, surišėjais. Šios medžiagos sumažina toksinų patekimą į kraują ir taikininis organus. Tai mažos molekulinės masės junginiai, gebantys surišti mikotoksinus virškinamajame trakte neskaidant jų, kurie iš organizmo išsiskiria su išmatomis. Adsorbuojančiomis medžiagomis gali būti neorganiniai junginiai su siliciu arba anglies organiniai polimerai [25].

Biotransformuojančios medžiagos, tokios kaip bakterijos/mikroskopiniai grybai ar fermentai, skaido mikotoksinus į ne toksinius metabolitus (1.7.1 lentelė).

1.7.1 lentelė. *Biologiniai veiksniai mikotoksikogeninių grybų ir mikotoksinų kontrolei [166]*

Naudojama prieš mikotoksikogeninį mikromicetą	Naudojama prieš mikotoksiną	Biologinis veiksnys
<i>A. flavus, A. parasiticus</i>	Aflatoksinas	Atoksikogeninė <i>Aspergillus</i> padermė
<i>Aspergillus</i> spp.	Aflatoksinas	Pienarūgštės bakterijos
<i>Aspergillus</i> spp.	Aflatoksinas	Mikromicetų padermės detoksikuojančios aflatoksinus
<i>A. carbonarius, A. niger</i>	Ochratoksinas A	Filosferos mikroorganizmai (pvz., <i>Aureobasidium pullulans</i>)
<i>F. verticilloides</i>	Fumonizinas	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Kluyveromyces</i> spp.
<i>F. graminearum, F. culmorum</i>	DON	<i>F. equiseti</i> , mielės, <i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Penicillium expansum</i>	Patulinas	<i>A. pullulans</i> , <i>P. syringae</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>

Medžiagos, kurios tiesiogiai nesąveikauja su mikotoksinais, pvz., antioksidantai, imunostimuliatoriai, nepriskiriami *sensu stricto* mikotoksinus detoksikuojančioms medžiagoms.

2. DARBO METODIKA

2.1. Tyrimų laikas ir vieta

Mokslinis tiriamasis darbas atliktas 2011–2016 metais.

2011–2013 metais iš skirtingų Lietuvos ūkių, esančių skirtinguose regionuose, taikančių skirtingas ūkininkavimo sistemas, surinkta žaliava (smulkintas kukurūzas ($n = 20$), daugiamečių miglinių ir pupinių žolių mišinys ($n = 40$)) ir iš jos pagaminti silosuoti pašarai (kukurūzo silosas tranšėjose ($n = 40$); daugiamečių miglinių ir ankštinių žolių mišinys silosuotas į ritinius ($n = 40$)).

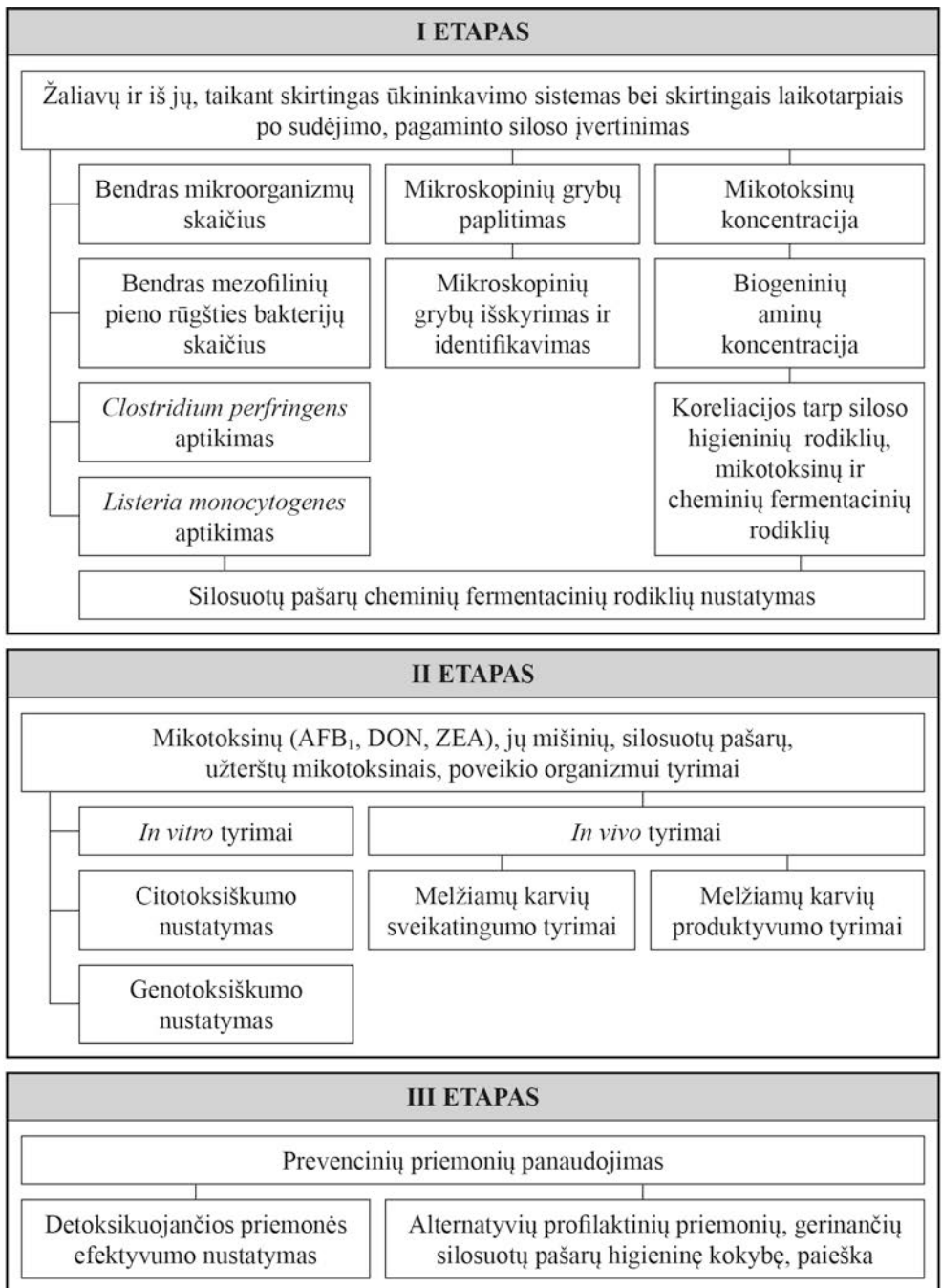
Mikrobiologiniai ir mikotoksikologiniai (DON, ZEA, T-2, OTA, AFB₁) tyrimai atlikti LSMU VA Gyvūnų gerovės tyrimų laboratorijoje. Mikotoksinų DON, ZEA, AFB₁ citotoksiškumas ir genotoksiškumas įvertintas LSMU VA Biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institute.

2012 metais, vasario-kovo mėnesiais melžiamų karvių ūkyje atliktas mikotoksinais užterštų pašarų poveikio karvių sveikatingumui bei produktyvumui įvertinimas.

2013 metais Lenkijoje Olštyno Varmijos-Mazūrijos universitete, Gyvūnų bioinžinerijos fakultete, nustatytos lakiosios riebalų rūgštys, biogeniniai aminorai, amoniakinis azotas silosuotuose pašaruose.

2011–2015 metais LSMU VA Gyvūnų gerovės tyrimų laboratorijoje nustatytos mikotoksinų AFB₁, ZEA, DON koncentracijos iš įvairių Lietuvos ūkių atvežtų silosuotų pašarų mėginiuose. Pašarai atvežti savikontrolės tikslais ar esant neaiškios kilmės melžiamų karvių sveikatingumo problemoms, įtariant silosuotų pašarų užterštumą mikotoksinais.

2013–2015 metais nustatyta augalinių ekstraktų įtaka silosuotų pašarų higieninei kokybei. Mėginių cheminių rodiklių analizė atlikta Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filiale, Žemdirbystės institute. Timolio ir karvakrolio koncentracijos nustatytos Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Fizinių ir technologijos mokslų centre.



2.1 pav. Darbo schema

2.2. Žaliavos ir iš jos pagaminto siloso mėginių paėmimas

2011–2012 metais iš 20 skirtingų įprastinės gamybos ūkių smulkinta kukurūzų žaliava prieš sudėjimą paimta prieš fermentaciją (spalio pabaiga ir lapkričio pradžia) ir iš jų tranšėjose pagamintas silosas po sudėjimo paimtas du kartus, t. y. vasario ir kovo mėnesiais (3 mėn. po sudėjimo) ir birželio mėnesį (8 mėnesiai po sudėjimo) (PUBLIKACIJA II).

2012–2013 metais daugiamečių miglinių (*Poaceae*) ir pupinių (*Fabaceae*) žolių mišinys, pirmo pjovimo (gegužės pabaiga ir birželio pradžia), kurio didesnę dalį sudarė miglinės žolės, prieš susukant į ritinius pavytintas iki 24 val. (priklausomai nuo aplinkos sąlygų). Ir iš tų pačių ūkių silosuočių pašarų į ritinius (vasario ir kovo mėnesiai) mėginiai paimti iš 20 sertifikuotų ekologinių ir 20 įprastinės gamybos ūkių. Fermentuoti mėginiai buvo imami, atidarius ritinius prieš šerimą. (PUBLIKACIJA III).

Silosuoti pašarai buvo pagaminti be fermentaciją gerinančių inokuliantų ar kitų priedų. Prieš paimant mėginius, žaliava ir silosas įvertinti jusliškai: įvertinta spalva, kvapas, patikrinta, ar nėra supelijęs. Tolimesniam tyrimui paimti tik tie mėginiai, kurie įvertinus jusliškai buvo geros kokybės, nesupeliję. Vieną jungtinį mėginį sudarė 2–3 kg žaliavos ar siloso, jį sudarė 8–10 atskirų ėminių iš skirtingų pašaro tiriamos dalies laikymo vietų. Iš šių mėginių sudarytas 1–2 kg mėginys laboratoriniams tyrimams. Mėginiai sudėti į hermetiškus maišelius ir pašalintas oras. Pristačius į laboratoriją, nustatytas SM kiekis ir mėginiai laikyti –20 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų

2011–2015 metų laikotarpyje į Gyvūnų gerovės tyrimo laboratoriją pristatyti silosuoti pašarai iš įvairių Lietuvos ūkių mikotoksinų tyrimams savikontrolės tikslais ar esant neaiškios kilmės, neinfekcinių ligų protrūkiams. Šiuo laikotarpiu ištirti 106 mėginiai, iš jų: 32 kukurūzų siloso mėginiai, 40 mėginių – daugiamečių žolių siloso, 15 mėginių daugiamečių žolių siloso, susukto į ritinius, 19 mėginių – kukurūzų grūdainio. Pagal silosuočių pašarų laikymo trukmę (nuo pagaminimo iki pateikimo tyrimams) mėginius suskirstėme į tris grupes: 1–2 mėn., 3–7 mėn. ir daugiau nei 8 mėn. po siloso sudėjimo ar susukimo į ritinius. Kukurūzų ar daugiamečių žolių silosą ūkininkai pradeda tirti ir naudoti praėjus daugiau kaip mėnesiui nuo sudėjimo. Taip pat kukurūzų ir daugiamečių žolių siloso mėginiai yra atvežami mikotoksinų tyrimui ir po 8 mėnesių laikymo, tai yra prasidėjus ganykliniam laikotarpiui.

Nustatytų mikotoksinų koncentracijų skirtumai skirtingais periodais po sudėjimo ir atskirais metais susieti su meteorologinėmis sąlygomis silosavimo metu. Meteorologinėms sąlygoms apibūdinti remtasi Lietuvos hidrometeorologinių stočių duomenimis (2.2.1 lentelė).

2.2.1 lentelė. 2011–2015 metų vidutinė oro temperatūra ir kritulių kiekis

	Temperatūra, °C					Kritulių kiekis, mm				
	2011	2012	2013	2014	2015	2011	2012	2013	2014	2015
Balandis	9,1	8,0	5,6	8,9	6,6	26,4	71,7	5,2	21,1	55,0
Gegužė	12,5	13,1	16,2	13,4	10,7	45,6	49,4	63,1	75,4	67,8
Birželis	18,0	15,5	18,5	14,8	14,5	52,9	83,2	47,2	57,4	42,5
Liepa	19,9	19,6	18,7	20,5	16,8	145,8	110,0	96,5	70,6	97,5
Rugpjūtis	17,7	17,5	18,3	18,2	19,2	152,8	69,3	66,0	110,2	15,3
Rugsėjis	14,3	13,9	12,7	13,9	14,2	75,3	66,4	106,2	20,0	55,0
Spalis	15,7	7,7	9,1	7,8	6,7	20,4	74,4	43,4	90,5	15,3
Lapkritis	3,6	4,9	5,0	2,8	4,9	14,3	71,1	61,8	30,2	84,5

2.3. Žaliavų ir iš jų gamintų silosuotų pašarų higieninių rodiklių nustatymas

Bendro mikroorganizmų skaičiaus nustatymas. Bendras mikroorganizmų skaičius (toliau BMS) (daugiamečių miglinių ir pupinių žolių žaliava (n = 40), silosas (n = 40)) nustatytas vadovaujantis Bendro mikroorganizmų skaičiavimo metodu. 1 dalis. Kolonijų skaičiavimas 30 °C temperatūroje, taikant lėkštelių užpylimo būdą (ISO 4833-1:2013).

Bendro mezofilinių pieno rūgšties (pienarūgščių) bakterijų kolonijų vienetų skaičiaus nustatymas. Nustatyta (kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 40) ir daugiamečių miglinių ir pupinių žolių (n = 40), silosas (n = 40)) pagal ISO 15214:2009 Maisto ir pašarų mikrobiologiją. Taikytas bendras mezofilinių pieno rūgšties bakterijų skaičiavimo metodas. Kolonijų skaičiavimo 35 °C temperatūroje. Naudota MRS agarų terpė (MRS/agar with Tween 80, Biolife, Italija). 10 g siloso ar jo žaliavos mėginio sumaišyta su 90 ml fiziologinio tirpalo (0,9 proc.). Iš gautos suspensijos paruošta nuo 10⁻² iki 10⁻⁸ skiediniai, kurie pasėti į Petri lėkšteles su MRS agaru. Lėkštelės su mėginiais 72 val. laikytos 35 °C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis. Skaičiuotos katalazei neigiamos bakterijų kultūros.

***Clostridium perfringens* nustatymas.** Nustatyta (kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 20) ir daugiamečių miglinių ir pupinių žolių silosas (n = 20)), remiantis LST EN ISO 7937:2004 Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis lūžinių klostridijų (*Clostridium perfringens*) skaičiavimo metodas. Kolonijų skaičiavimo metodas. Neidentifikavus *Clostridium* genties iki rūšies priskirta – *Clostridium* spp.

***Listeria monocytogenes* nustatymas.** Nustatyta kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 20) ir daugiamečių miglinių ir pupinių žolių silosas (n = 20)), remiantis LST EN ISO 11290-2:2003/A1:2005 Maisto ir pašarų mikrobiolo-

gija. Monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimas ir skaičiavimas. Neidentifikavus *Listeria* genties iki rūšies priskirta – *Listeria* spp.

Mikroskopinių grybų ir mielių išskyrimas bei identifikavimas.

Mikroskopinių grybų išskyrimui (kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 40) ir daugiamečių miglinių ir pupinių žolių (n = 40), silosas (n = 40)) buvo naudojamos agarizuotos Czapek-Dox Modified Agar (OXOID, UK) (ČA), Sabouraud Dextrose Agar (OXOID, UK) (SA) su chloramfenikoliu (50 mg/l). Žaliavoje ir silosuotame pašare mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius (ksv/g) nustatytas vadovaujantis Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis mielių ir pelėsinų grybų skaičiavimo metodas. 1 dalis. Kolonijų skaičiavimo būdas produktuose, kurių vandens aktyvumas didesnis kaip 0,95 (tapatus ISO 21527-1:2008).

Silosuotų pašarų ir jų žaliavos (kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 40) ir daugiamečių miglinių ir pupinių žolių (n = 40), silosas (n = 40)) tiesioginis užkrėstumas mikroskopiniais grybais, kurie aptinkami ant išorinio mėginio dalelių paviršiaus, įvertintas naudojant tiesioginį sėjimo metodą, t. y. iš kiekvieno mėginio steriliu pincetu paimti pašaro mėginio gabalėliai ir tolygiai išdėstyti 3 Petri lėkštelėse (1 lėkštelėje – 10 gabalėlių) ant SA ir ČA terpių su chloramfenikoliu. Lėkštelės su mėginiais laikytos 26 ± 2 °C temperatūroje. Augančios mikroskopinių grybų kolonijos vertintos 5-tą, 7-tą, 10-tą vystymosi parą. Mikroskopinių grybų rūšys identifikuotos pagal kultūrinius ir morfologinius požymius šviesinės mikroskopijos metodu, vadovaujantis apibūdintojais [110, 140].

Mielių (kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 40) ir daugiamečių miglinių ir pupinių žolių (n = 40), silosas (n = 40)) kiekybiniam užterštumui nustatyti naudota SA su chloramfenikoliu (50 mg/l).

Mikroskopinių grybų, atsakingų už mikotoksinų gamybą, identifikavimas PGR metodu. Pirminis mikroskopinių grybų identifikavimas iki genčių atliktas mikroskopuojant išaugusias gentis ant agarizuotos ČA terpės pagal morfologines charakteristikas. Tyrimų metu atrinkta 30 morfologiškai skirtingų mikromicetų genčių, *Fusarium* spp. – 16, *Penicillium* spp. – 7, *Aspergillus* spp. 7.

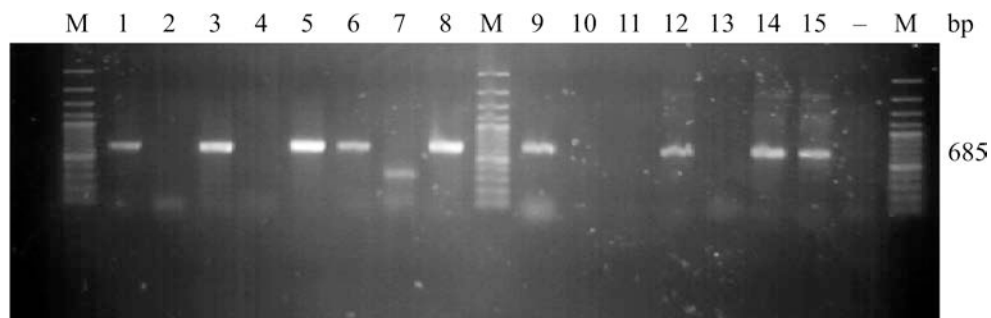
Mikroskopinių grybų kultūros DNR išskyrimui augintos 7 paras 26 ± 2 °C tamsoje ant ČA terpės. Po 7 parų micelis (100-150 mg) su steriliu skalpeliu surinktas ir perkeltas į mėgintuvėlius (kiekviena kultūra atskirai) su stikliniais rutuliukais. DNR išskyrimui naudotas komercinis rinkinys „Genomic DNA from Plant“ (Macherey-Nagel), vadovautasi gamintojo protokolu.

Remiantis literatūros duomenimis, įsigytos oligonukleotidų sekos (pradmenys), reikalingos šių mikromicetų identifikacijai iki rūšių. Mikroskopinių grybų identifikacijai naudoti specifiniai oligonukleotidiniai pradmenys (2.3.1 lentelė).

Amplifikacijai naudotas tremocikleris (GeneAmp* PCR system 9700). Bendras PGR reakcijos mišinio kiekis vienai reakcijai – 25 µl. Kiekvienas PGR mišinys ruoštas iš 12,5 µl Dream Taq Green DNA PCR Master Mix, 2×1 µl specifinių pradmenų, 10,5 µl PGR vandens. Amplifikacijos režimai naudoti pagal pradmenų specifikaciją nurodytą literatūroje. Elektroforezė atlikta 3,0 proc. agarozės gelyje.

2.3.1 lentelė. *Pradmenų sekos naudotos mikroskopinių grybų identifikavimui [36, 42, 49, 134]*

Pradmenų specifiškumas	Pradmuo	Seka (5'-3')	DNR dydis (bp)
<i>Fusarium poae</i>	FP82F FP82R	CAAGCAAACAGGCTCTTCACC TGTTCCACCTCAGTGACAGGTT	220
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AF330109CF AF330109CR	AAAAGCCCCAAATTGCTGATG TGGCATGTTTCATTGTACCT	332
<i>Fusarium graminearum</i>	Fg16F Fg16R	CTCCGGATATGTTGCGTCAA GGTAGGTATCCGACATGGCAA	450
Tiesiogiai atsakingas už trichotecenų biosintezę	TRI6-forward TRI6-reverse	TGATTTACATGGAGGCCGAATCTCA TTCGAATGTTGGTGATTTCATAGTCGTT	131
Tiesiogiai atsakingas už DON biosintezę	Tri7DON-forward Tri7DON-reverse	TGCGTGGAATATCTTCTTCCTA GTGCTAATATTGTGCTAATATTGTGC	381–445
Tiesiogiai atsakingas už DON biosintezę	Tri13DON-forward Tri13DON-Reverse	CATCATGAGACTTGTGTCAGAGTTTGGG GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG	282
Tiesiogiai atsakingas už trichotecenų biosintezę	TRI5-forward TRI5-reverse	GCT GCT CATCACTTT GCT CAG CTG ATC TGG TCA CGC TCA TC	658
Tiesiogiai atsakingas už aflatoksinų biosintezę	APA-forward APA-reverse	TATCTCCCCCGGGCATCTCCCGG CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG	1034
Tiesiogiai atsakingas už aflatoksinų biosintezę	OMT-forward OMT-reverse	GGCCCGGTTTCCTTGGCTCCTAAGC CGCCCCAGTGAGACCCTTCCTCG	1254



2.3.1 pav. Polimerazės grandininės reakcijos po elektroforezės nuotrauka, naudojant TRI5 pradmenis (iš autoriaus archyvo)

M – DNR dydžio standartas; 1–15 – *Fusarium* spp. gentys; (–) – neigiama kontrolė.

2.4. Mikotoksinų nustatymo metodai

Mikotoksinų koncentracijos nustatymas plonasluoksne chromatografija (PSCh)

Plonasluoksnės chromatografijos (PSCh) metodu nustatyta mikotoksinų: aflatoksino B₁, zearalenono, deoksinivalenolio ir T-2 toksino, koncentracija pagal aprobuotas Romer Labs. Inc. (Austrija) metodikas. Siloso (n = 106) mėginiai buvo džiovinti 70 °C temperatūroje 24 val., 250 g mėginio buvo sumalta (Romer Series II Mill Romer Labs. Inc., Austrija), kad praeitų pro > 1 mm sietus. Tyrimui atsverta 25 g mėginio ir ekstraguota 100 ml 84/16 acetonitrilo/vandens mišiniu, maišant 3 min. aparatu Osterizer blender (Romer Labs. Inc., Austrija). Mėginio ekstraktas perfiltruotas per Whatman Nr. 1 fitrą (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, JAV).

Nustatant ZEA ir AFB₁ mikotoksinų koncentracijas, ekstrakto valymui panaudotos MycoSep® 226 valymo kolonėlės (Romer Labs. Inc., Austrija). 2 ml išvalyto ekstrakto perkelta į mėgintuvėlį ir išgarinta, panaudojant Romer EvapTM sistemą (Romer Labs. Inc., Austrija). Ekstrakto nuosėdos ištirpintos 300 µl 97/3 toluolo/acetonitrilo mišinyje. Esant 60 °C temperatūrai, aparatu AutoSpotter, Model 10 (Romer Labs. Inc., Austrija) ant silicio gelio chromatografinės plokštelės Silica gel 60 F₂₅₄ (Romer Labs. Inc., Austrija) su specialiais mikrošvirkštais užnešama AFB₁ (2 µg/ml acetonitrilo) (Romer Labs. Inc., Austrija) ar ZEA (100 µg/ml acetonitrilo) (Romer Labs. Inc., Austrija) 10, 20, 40, 80 µl standartų ir 80 µl mėginio. Rezultatų išryškinimui plokštelė įmerkiama į 9/1 chloroformo/acetono mišinio vonelę. Laikoma, kol tirpalas pakyla iki 1 cm plokštelės viršaus. Plokštelė išdžiovinama ore. Toksinų koncentracijos įvertinamos ultravioletinių spindulių (UV) fone. AFB₁ švyti mėlynai, kai R_f ≈ 0,45, ZEA švyti žaliai, kai R_f ≈

0,9. Mikotoksino koncentracija paskaičiuojama $\mu\text{g/kg}$: ant PSCh plokštelės kiekvienas toksinas tiriamajame mėginyje matomas ng, mėginio ekvivalentas 0,15 g. ppb = $X \div 0,15$, kur ppb – toksino koncentracija mėginyje ($\mu\text{g/kg}$); X – mikotoksino koncentracija ant plokštelės ng; 0,15 – mėginio ekvivalentas (0,15 g). Aptikimo riba – ZEA – 10 ppb; AFB₁ – 1 ppb.

Nustatant DON ir T-2 toksino koncentracijas mėginiuose PSCh metodu, mėginių paruošimas toks pat, kaip nustatant ZEA ir AFB₁. Mėginio ekstrakto valymui panaudotos MultiSep® 216 ir MycoSep® 227 valymo kolonėlės (Romer Labs. Inc., Austrija). 13 ml išvalyto ekstrakto išgarinta Romer EvapTM sistema. Ekstrakto nuosėdos ištirpintos 320 μl 97/3 tolueno/acetonitrilo mišinyje. Į specialius mikrošvirkštus pritraukus 10, 20, 40, 80 μl DON ar T-2 toksino standartų (100 $\mu\text{g/ml}$ acetonitrilo) (Romer Labs. Inc., Austrija) ir 80 μl tiriamo mėginio, PSCh aparatu AutoSpotter, Model 10 užnešamas standartas ir tiriamasis mėginys ant Silica gel 60 F₂₅₄ chromatografinės plokštelės 60 °C temperatūroje. Rezultatų išryškinimui DON koncentracijos nustatymui Silica gel 60 F₂₅₄ plokštelė įmerkama į 1/2 toluolo/acetono mišinio vonelę, T-2 toksino nustatyti Silica gel 60 F₂₅₄ plokštelė – 25/15/1 metanolio/vandens/acto rūgšties mišinį. DON plokštelė apipurškiama 15 proc. aliuminio chloridu metanolyje, T-2 toksino – 10 proc. sieros rūgšties metanolyje. Plokštelė išdžiovinama ore. Toksino koncentracija nustatoma, pakaitinus Silica gel 60 F₂₅₄ plokštelę su mėginiais ir standartais 150 °C temperatūroje 5 min., ultravioletinių spindulių (UV) fone (360 nm). DON ir T-2 švyti mėlynai, kai DON R_f $\approx$ 0,5, T-2 toksinui R_f $\approx$ 0,2. Toksino koncentracija tiriamajame mėginyje matomas ng, mėginio ekvivalentas 0,2 g. ppb = $X \div 0,2$, kur ppb – toksino koncentracija mėginyje ($\mu\text{g/kg}$); X – mikotoksino koncentracija ant plokštelės ng; 0,2 – mėginio ekvivalentas (0,2 g). Aptikimo riba – DON – 10 ppb, T-2 toksino – 10 ppb.

Gliotoksinas nustatytas PSCh metodu, remiantis pakoreguota Boudra ir Morgavi [26] metodika. Tai kokybinis gliotoksino nustatymo tyrimas, nes šio toksino ryškumas priklauso nuo fluorescencijos, kas mažina šio metodo jautrumą. Prieš tyrimus, mėginiai buvo džiovinti 48 °C temperatūroje 72 val. ir sumalti. 10 g mėginio ekstraguota 50 ml 1/4 distiliuoto vandens ir dichlormetano mišiniu kratant 2 val. kambario temperatūroje. Perfiltruota per Whatman Nr. 1 filtrą. 5 ml ekstrakto praleista per anglies pagrindo kolonėlę. 3 ml ekstrakto išgarinta (60 °C), panaudojant Romer® Evap sistemą.

Nuosėdos ištirpintos 200 μl metanolyje, į specialius mikrošvirkštus pritraukus 10; 20; 40; 80 μl gliotoksino standarto (100 $\mu\text{g/ml}$ metanolis) ir 80 μl tiriamo mėginio. Gliotoksino standarto milteliai (Gliotoxin BioChemica, AppliChem, Vokietija) praskiesti metanolyje (1 mg/ml). PSCh aparatu AutoSpotter, Model 10 užnešamas standartas ir tiriamasis mėginys ant 20×20 cm, 0,25 mm storio chromatografinės plokštelės Silica Gel Merck 60

GF (Vokietija). Rezultatams išryškinti plokštelė įmerkiama į 98/2 chloroformo/metanolio tirpalą. Plokštelė apipurkšta 25 proc. sieros rūgšties tirpalu. Plokštelė išdžiovinama ore. Toksino koncentracija įvertinama plokštelę pakaitinus 110 °C 10 min. Vertinta UV fone 366 nm, gliotoksinas švyti silpnai geltona spalva. Mėginys vertintas teigiamai, kai apšvietus UV spinduliais pastebėtos gelsvos dėmės lyginant su gliotoksino standarto Rf.

Mikotoksinų koncentracijos nustatymas imunofermentine analize (IFA)

Siloso ir jo žaliavos mėginiai (kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 40), daugiamečių miglinių bei pupinių žolių žaliava (n = 40), silosas (n = 40)) išdžiovinti ir sumalti. Mikotoksinų, t. y. aflatoksinų (AF (bendrai)), deoksinivalenolio (DON), zearalenono (ZEA), T-2/HT-2, ochratoksino A (OTA), koncentracijos nustatytos imunofermentinės analizės metodu (IFA) (AOAC, 2000). Naudojant komercinius VERATOX® DON 5/5, VERATOX® T-2/HT-2 Toxin, VERATOX® Zearalenone, VERATOX® Aflatoxin, (Neogen, Škotija) rinkinius, patvirtintus AOAC (Sertifikato Nr. 950702). OTA nustatytas naudojant RIDASCREEN komercinį rinkinį ('R-Biopharm AG', Vokietija). Mikotoksinų ekstrakcija ir nustatymas atliktas pagal pateiktas komercinių rinkinių instrukcijas. DON ekstrakcijai naudotas distiliuotas vanduo; AF (bendras), ZEA, OTA ekstrakcijai – metanolis/vanduo (70:30 v/v); Absorbcija nustatyta mikro plokštelių spektrofotometru (Stat Fax 303 Plus, Neogen, JAV) – 650 nm, OTA – 450 nm. Išmatuotos absorbcijos perskaičiuotos į mikotoksinų koncentracijas – µg/kg. Aptikimo ribos: DON – 100 µg/kg; ZEA – 10 µg/kg; T-2/H-2 – 10 µg/kg; AF (bendras) – 2 µg/kg.

Biogeniniai aminai kukurūzų silose (n = 24) ir daugiamečių miglinių bei pupinių žolių silose (n = 20) nustatyti aukšto slėgio skysčių chromatografija (HPLC) aparatu „Shimadzu“ su UV-VIS detektoriumi (bangų ilgis 546 nm) pagal [81].

2.5. Siloso ir jo žaliavos cheminės fermentacinės sudėties tyrimo metodika

Kukurūzų siloso (n = 40) fermentaciniai rodikliai: pH, amoniakinis azotas, fermentinių rūgščių suma, pieno r., acto r., sviesto r., išanalizuoti artimosios srities infraraudonųjų spindulių spektrometru (NIRS-6500) pagal ADAS (Anglija) metodiką.

Kukurūzų žaliavos (n = 20) ir siloso (n = 40) kokybės analizė: žali baltymai, pelenai, nesuvirškinta organinė medžiaga, neutralaus detergento tirpale netirpi ląsteliena, žalia ląsteliena, krakmolai, žali riebalai, nustatyti

išdžiovintuose siloso mėginiuose artimosios srities infraraudonųjų spindulių spektrometru (NIRS-6523,800), apykaitos energija, neto energija laktacijai bei fermentacijos rodiklis, apskaičiuoti pagal VDLUFA (Vokietija) metodiką.

Daugiamečių miglinių ir pupinių žolių siloso (n = 20) kokybės analizė: apykaitos energija, neutraliame tirpale išplauta ląsteliena, pelenai, žali baltymai, baltymų skilimas, amoniakinis azotas, fermentinių rūgščių suma, pieno, acto, sviesto rūgštys, išanalizuota artimosios srities infraraudonųjų spindulių spektrometru (NIRS-6500) pagal ADAS (Anglija) metodiką

Lakiosios riebalų rūgštys (kukurūzų silose (n = 24) ir daugiamečių miglinių bei pupinių žolių silose (n = 20)) nustatytos aukšto slėgio skysčių chromatografija (HPLC) aparatu „Shimadzu“ su SDP-20A UV/Vis detektoriumi (bangų ilgis 210 nm) pagal [91,69].

Amoniakinio azoto (NH₃-N) (kukurūzų silose (n = 24) ir daugiamečių miglinių ir pupinių žolių silose (n=20) kiekis siloso mėginiuose nustatytas – Conway metodu pagal [147].

Sausųjų medžiagų kiekis (kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 40) ir daugiamečių miglinių bei pupinių žolių žaliava (n = 40), silosas (n = 40)) nustatytas svorio metodu.

pH rodiklis (kukurūzų žaliava (n = 20), silosas (n = 40) ir daugiamečių miglinių bei pupinių žolių žaliava (n = 40), silosas (n = 40)) nustatytas elektrometriniu metodu, naudojant WTW®inoLab pH 720 (Vokietija) prietaisą [9].

2.6. Mikotoksinų toksiškumo įvertinimas *in vitro*

Kristalinių mikotoksinų DON, ZEA ir AFB₁ (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Vokietija) sinergistinio poveikio ląstelių apoptozei ir proliferacijai įvertinti pasirinktos organų taikinių ląstelių kultūros: HeLa, BHL-21, PKEL, MH-22A.

Ląstelių linijos:

- BHL-21 pelių inkstų linija – Sirijos žiurkėno vienos dienos amžiaus individo inkstų ląstelės (*baby hamster kidney fibroblasts*);
- HeLa – pastovi žmogaus gimdos kaklelio vėžio ląstelių linija;
- PKEL – pirminės, žiurkės plautinio kamieno endotelinių ląstelių linija;
- MH-22A – pelės hepatomos ląstelių linija.

Ląstelės gautos iš VU Biochemijos instituto.

BHL-21, MH-22A ląstelės buvo augintos DMEM (su L-gliutaminu, be natrio piruvato, gliukozė 4,5 g/l, BIOWEST SAS, Prancūzija) terpėje

(Sigma-Aldrich, Vokietija), PKEL-IMDM terpėje (su 25 mM HEPES buferiu ir L-gliutaminu, gliukozė 4,5 g/l, LONZA, Belgija), HeLa – MEM terpėje (su natrio bikarbonatu, su L-glutaminu, Sigma-Aldrich, Vokietija), su 10 proc. FVS (fetalinis veršelio serumas) (Sigma-Aldrich, Vokietija) ir 1 proc. antibiotikų (10000 vnt./ml penicilino ir 10 mg/ml streptomicino) (Sigma-Aldrich, Vokietija). Ląstelės buvo augintos 75 cm³ tūrio ląstelių auginimo induose (TPP, Švedija), termostate su 5 proc. CO₂ koncentracija, 98 proc. santykinio drėgnumu, 37 °C temperatūroje.

Ląstelių linijos buvo augintos monosluoksniu, persėjant kas 3-4 dienas. Ląstelių monosluoksniui nuimti naudotas 0,025 proc. tripsino/EDTA fosfatiname buferyje (PBS) tirpalas (Sigma-Aldrich, Vokietija). Tyrimams naudota 2,5·10⁵ iki 3,0·10⁵ ląstelių/ml suspensija. Ląstelių tankis skaičiuotas Neubauerio hemocitometru (Neubauer improved, Heinz Herenz Medizinalbedarf, Vokietija).

Siloso mėginių ekstraktų paruošimas. *In vitro* tyrimais įvertintas 6 siloso mėginių, užterštų mikotoksinais, citotoksinis poveikis ląstelių kultūroms remiantis pakoreguotomis [113, 130] metodikomis. Tyrimams atrinktuose mėginiuose su skirtingomis mikotoksinų AFB₁, DON, ZEA, T-2 koncentracijomis (2.6.1 lentelė) citotoksiškumas nustatytas PSCh metodu. Iki tyrimų, siloso mėginiai buvo laikomi –20 °C temperatūroje. 25,0 g sumalto tiriamo mėginio ekstraguota 100 ml 84/16 acetonitrilo/vandens mišiniu, maišant 3 min. Mėginio ekstraktas perfiltruotas per Whatman Nr. 4 filtrą.

Silosuotų pašarų, užterštų mikotoksinais, citotoksiškumui nustatyti panaudotos organų taikinių ląstelių linijos. Siloso ekstraktų citotoksinis poveikis, sukėlęs daugiau nei 50 proc. ląstelių žūtį po 72 val., gali būti aiškinamas dėl to, kad pats siloso ekstraktas, neatsižvelgiant į jame esantį mikotoksinų kiekį, gali daryti neigiamą įtaką ląstelių proliferacijai dėl savo žemo pH (<4) ir mažo sausų medžiagų kiekio. Todėl analizuojant duomenis būtina į tai atkreipti dėmesį [130]. Tyrimui naudojant skirtingas ląstelių linijas, nustatytas siloso ekstraktų toksiškumas vertinamas tik po 24 ir 48 val. Tyrimui pasirinkti žolių siloso mėginiai.

2.6.1 lentelė. Mikotoksinų koncentracijos pašaruose

Siloso mėginio numeris	Mikotoksinų koncentracijos, ppm (µg/kg)			
	AFB ₁	ZEA	DON	T-2
1.	N	670	250	25
2.	3	150	500	N
3.	N	500	500	N
4.	N	270	550	50
5.	N	130	450	60
6.	13	1200	N	N

N – nenustatyta.

Tiriamųjų mėginių, užterštų DON ir T-2 toksinais, ekstraktų valymui panaudotos MultiSep® 216 ir MycoSep® 227 valymo kolonėlės (Romer Labs. Inc., Austrija), užterštų AFB₁ ir ZEA mėginių ekstraktų valymui panaudotos MycoSep® 226 valymo kolonėlės (Romer Labs. Inc., Austrija). 7 ml išvalyto ekstrakto (10 ml ekstrakto atitinka 2,5 g mėginio) perkelta į mėgintuvėlį ir išgarinta, panaudojant Romer EvapTM sistemą. Ekstrakto nuosėdos ištirpintos 2 µl DMSO (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Vokietija) ir 50 µl ląstelių kultivavimui skirtoje terpėje, priklausomai nuo ląstelių linijos. Ląstelių kultūros išpilstytos po 100 µl į plokštelę su 96 šulinėliais, po 24 val. ant ląstelių sluoksnio užpilta po 50 µl siloso ekstrakto. Į kontrolines akutes įpilta 50 µl ląstelių mitybinės terpės. Citotoksiškumas vertintas po 24 val., 48 val. ir 72 val.

Pašarų citotoksiškumo nustatymas. Tiriamųjų mėginių paruošimas: kiekvienas tiriamasis mėginys buvo ištirpintas 1 ml DMSO ir praskiestas ląstelių augimo terpe (DMEM, IMDM, MEM). Tiriamųjų mėginių tirpalų pH korekcija (iki 7,0) atlikta su 0,1 M natrio šarmu (NaOH). Tiriamųjų mėginių tirpalai nufiltruoti aseptinėmis sąlygomis per baktericidinį filtrą (Q-Max® Syringe Filter 25 mm, 0,22 µm, Danija)

Kristalinių mikotoksinų citotoksiškumo nustatymas. Kristaliniai mikotoksinais atskiesti DMSO. Atlikti jų skiedimai iki reikiamos koncentracijos ląstelių augimo terpėje, priklausomai nuo ląstelių linijos.

Testavimas. Ląstelių suspensijos augimo fazėje išpilstytos į 96 šulinėlių plokšteles. Plokštelės užpildytos pagal pasirinktą schemą (2.3.2 pav.).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
B	R	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	K	R
C	R	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	K	R
D	R	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	K	R
E	R	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	K	R
F	R	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	K	R
G	R	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	K	R
H	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

2.3.2 pav. Audinių kultūrų plokštelių užpildymo principas

R – rėmelis skaičiavimui nenaudotas; TM – tiriamasis mėginys; LK – ląstelių kultūros kontrolė.

- 1) Į kiekvieną plokštelės šulinėlį įpilta 100 µl ląstelių suspensijos su joms tinkančia augimo terpe;
- 2) Po 24 val. į atitinkamus šulinėlius įpilta 50 µl tiriamojo mėginio arba tam tikros koncentracijos kristalinių mikotoksinių tirpalų;
- 3) Plokštelės su ląstelių kultūra ir tiriamaisiais mėginiais laikytos termostate su 5 proc. CO₂ koncentracija, 98 proc. santykinio drėgnumu, 37 °C temperatūroje, 24 val.

Ląstelių apoptozės nustatymas. Ląstelių gyvybingumas nustatytas po 24 val., 48 val., 72 val., dažant kristaliniu violetiniu (KV) (Carl Roth GmbH, Vokietija) [108,170]. Tai kolorimetrinis metodas pagrįstas KV dažo prisijungimu prie baltymo. Atšokusios, negyvybingos ląstelės nupiltos, likusios ląstelės praplautos 0,9 proc. NaCl, 10 min. fiksuotos 96° etanolio ir dažytos 40 µl 0,05 proc. kristalinio violetinio tirpalo 20 ml etanolyje. Po 20 min. dažas nupiltas, 5–7 kartus praplauta vandeniu, eliujuota 50 µl 0,1 proc. acto rūgšties vandeniniu tirpalu 50 ml etanolyje. Gyvybingų ląstelių skaičius nustatytas išmatuojant tirpalo optinį tankį, esant bangos ilgiui – 570 nm ir 620 nm, spektrofotometru Multiskan MS (Suomija).

Apskaičiuota ląstelių apoptozė procentais:

$$\text{Proc. ląstelių apoptozė} = \frac{\text{Gyvybingų ląstelių skaičius (paveikus mikotoksinais)}}{\text{Gyvybingų ląstelių skaičius (kontrolė)}} \times 100$$

Ląstelių proliferacijos nustatymas. Ląstelių proliferacija nustatyta MTT metodu, panaudojus 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidą (Sigma, Vokietija). Ląstelės paveikiamos MTT, kuris yra nuo NAD (P)H priklausomos oksidoreduktazės substratas. Susidariusio netirpaus metabolito (formazano) kristalų kiekis yra tiesiogiai proporcingas gyvų ląstelių skaičiui. Po 24 val., 48 val., 72 val. nupylus nuo ląstelių terpę, į kiekvieną plokštelės šulinėlį įpilta po 20 µl 0,5 mg/ml MTT fosfatiname buferyje tirpalo. Inkubuota 3 val. 37 °C temperatūroje. Po to į kiekvieną plokštelės šulinėlį įpilta po 100 µl 96° etanolio ir išmaišoma pipetuojuant. Ląstelių mitochondrijose yra dehidrogenazės, kurios MTT dažą redukuoja į formazaną, kuris yra spalvotas ir ištirpinamas. Ląstelių proliferacija nustatyta išmatuojant tirpalo optinį tankį, esant bangos ilgiui – 540 nm ir 580 nm, spektrofotometru Multiskan MS (Suomija).

Apskaičiuota ląstelių proliferacija procentais:

$$\text{Proc. ląstelių proliferacija} = \frac{\text{Gyvybingų ląstelių skaičius (paveikus mikotoksinais)}}{\text{Gyvybingų ląstelių skaičius (kontrolė)}} \times 100$$

Siloso ir kristalinių mikotoksinų citotoksinis poveikis įvertintas, lyginant tiriamųjų mėginių ir testavimui panaudotų grynų ląstelių kultūrų duomenis – IC₅₀ verte. IC₅₀ laikoma teigiama, kai ląstelių žūtis didesnė negu 50 proc.

Mikotoksinų genotoksiškumo įvertinimas. Tyrimas atliktas standartiiniu citogenetiniu metodu su nedideliais pakeitimais, įterpiant kristalinius mikotoksinius ZEA ir DON, AFB₁ bei jų mišinį ZEA ir DON, remiantis Lioi ir kt. metodika [94, 99]. Kristaliniai mikotoksinai buvo atskiesti DMSO. Atlikti jų skiedimai iki reikiamos koncentracijos ląstelių augimo terpėje. Tyrimui naudotos melžiamų karvių periferinio kraujo ląstelės, t. y. limfocitai, paveikiant jas skirtingų koncentracijų mikotoksinais metafazės stadijoje.

Periferinis kraujas iš jungo venos imtas 3 juodmargėms kliniškai sveikoms karvėms LSMU VA Praktinio mokymo bandymų centre, Muniškių fermoje. Karvės buvo laikytos vienodomis sąlygomis, vienodo amžiaus, laktacijos. Karvių kraujas imtas į sterilius vakuuminius mėgintuvėlius su heparinu (MBI Fermentas, Lietuva). Kraujo mėginiai kultivuoti 38 °C, 72 val. Dešimčiai mėginių ruošama: 40 ml RPMI-1640 terpės (su 10 µg/ml L-glutaminu, NaHCO₃) (Sigma, JAV), įdedama 0,4 ml fitohemaglutinino PHA-E (5 mg, Biochrom AG, Vokietija) ir 0,05 ml gentamicino (Gentamicin Krka, Slovėnija). Atskiri mikotoksinai ir jų mišiniai buvo įterpti iškart po mitogenų stimuliacijos. Limfocitų kultūra apdorota kolchicinu (Sigma,

JAV) 0,02 ml, likus 2 val. iki kultivavimo pabaigos, vėliau – hipotoniniu tirpalu (KCl 0,075 M) (Sigma, JAV). Chromosomos fiksuotos metanolio ir ledinės acto r. tirpalų mišiniu (3:1). Prieš vertinimą chromosomos buvo dažytos Gimzos dažais (Sigma, JAV). Chromosomų preparatai tirti ir analizuoti optiniu mikroskopu „Nikon“ su imersiniu objektyvu. Kiekvienam individui tirta po 50 metafazių. Stebėti ir vertinti šie chromosomų pokyčiai: chromosomų aberacijos: chromatidžių trūkiai (delecija D₁), chromosomų trūkiai (delecija D₂), fragmentai (F), spragos (S₁, S₂), poliploidija (3n, 4n ...), aneuploidija (2n±1; 2 ...).

2.7. Mikotoksinais užterštų pašarų poveikio melžiamoms karvėms įvertinimas bei detoksikuojančio preparato efektyvumas

Tyrimas atliktas 2013 metais tvartiniu laikotarpiu (vasario-balandžio mėn.) su 28 žalosiomis karvėmis X ūkyje (PUBLIKACIJA I). Karvės suskirstytos į 2 grupes (bandomąją ir kontrolinę) po 14 gyvulių. Trečios laktacijos dienų skaičius vidutiniškai – 122,0±15,9. Vidutinis pieno primilžis – 15,36 kg/d, pieno riebalų kiekis – 4,14±0,25 proc., baltymų kiekis – 3,06±0,04 proc., urėja – 23,80±1,35 mg proc. Bandymas truko 9 savaites (63 dienas).

Vienos karvės paros racioną sudarė 70 kg siloso ar šienainio, 18 kg koncentruotų pašarų ir kas trečią dieną 5 kg šieno. Laisvas priejimas prie švaraus geriamo vandens bet kuriuo metu. Nustatytos mikotoksinų koncentracijos pašaruose (PUBLIKACIJA I, 3 lentelė).

Kontrolinė karvių grupė šerta pašarais, kuriuose mikotoksinų koncentracija buvo tokia pat, kaip ir bandomosios grupės, tik neįterpiant į kombinuotąjį pašarą mikotoksinius detoksikuojančio preparato. Bandomoji karvių grupė šerta pašarais, natūraliai užterštais mikotoksinais AFB₁, ZEA, DON, ir kasdien su kombinuotu pašaru paduodant po 40,0 g, kiekvienai karvei atskirai, mikotoksinius detoksikuojančio preparato Mycofix Plus 3.E (Biomin GmbH, Austrija).

Bandymo metu, kas 7 dienas, abiejų karvių grupių buvo stebima bendra sveikatingumo būklė: kūno temperatūra, pulso ir kvėpavimo dažniai, didžiojo prieskrandžio sienos judesiai, išmatų konsistencija (PUBLIKACIJA, 2 lentelė).

Morfologiniai ir biocheminiai kraujo tyrimai. Galvijų kraujas iš v. *jugularis* paimtas į sterilius mėgintuvėlius su konservuojančiu tirpalu (Na citratas – 3,8 proc., EDTA) morfologiniams kraujo tyrimams ir į mėgintuvėlius be antikoagulantu biocheminiams kraujo tyrimams. Kraujas imtas prieš rytinį karvių šėrimą bandymo pradžioje ir pabaigoje. Morfologiniai kraujo rodikliai tirti LSMU VA Stambių gyvulių klinikinių tyrimų laboratorijoje analizatoriumi Abacus Junior Vet. Biocheminiai rodikliai ištirti Nacionali-

niame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, Radiologinių tyrimų skyriuje, naudojant automatinį biocheminį analizatorių COBAS INTEGRA 400 plus (Tegimenta Ltd. Roche, Šveicarija). Tirti glutamil transferazę (GGT), šarminę fosfatazę (ALP) kraujo serumo fermentai; nustatytas bendras baltymų kiekis (TB), albuminų kiekis, šlapalo kiekis. Gauti morfologinių kraujo rodiklių tyrimų rezultatai buvo lyginti su analizatoriaus „Abacus Junior Vet“ pateiktomis normomis kiekvieno gyvulio rūšiai atskirai, o biocheminių su „BAYR MED LT 2000“ normomis. Morfologinis leukogramos tyrimas atliktas suskaičiavus 100 leukocitų, tepinėlių nudažius Romanovskio-Gimzos būdu. IgA kraujo serume nustatytas imunologinės analizės metodu (ELISA) naudojant Galvijų IgA nustatymo rinkinį (Genway Biotech, Inc). Absorbancija nustatyta esant 450 nm bangos ilgiui spektrofotometru.

Pieno mėginių paėmimas ir tyrimas. Pieno kiekis buvo nustatytas kontrolinio melžimo metu. Mėginiai buvo tiriami VĮ „Pieno tyrimai“ prietaisu „LactoScope FTIR“ (FT1.0.2001; Delta Instruments, Olandija). Juose buvo nustatyti pieno riebalai, pieno baltymai ir ureja (šlapalas).

2.8. Augalinių ekstraktų, kaip profilaktinių priemonių, panaudojimas siloso higieninei kokybei pagerinti

Bandymai atlikti laboratorinėmis sąlygomis.

Tyrimams naudota: Čiobrelis žolė (*Thymi herba*) ir Raudonėlio žolė (*Origani herba*) (kilmės šalis Lietuva, gamintojas „Švenčionių vaistažolės“).

Augalinių ekstraktų gamyba skirtingo poliškumo tirpalais. Ekstraktai gaminti maceracijos būdu, naudojant vandeninį ir etanolinį tirpiklius pagal Handa ir kiti bei Tayel ir kiti metodikas. Džiovinami augalai susmulkinti, 25,0 g ir 50,0 g smulkintos augalų masės buvo sumaišyta su 200,0 ml distiliuoto vandens ir 70 proc. maistiniu etilo alkoholiu, uždengta ir palikta 24 val. kambario temperatūroje, apsaugant nuo tiesioginių saulės spindulių. Po 24 val. perfiltruota per Whatman Nr.1 filtrą. Pagamintas ekstraktas iškart įterpas į silosuojamą kukurūzų žaliavą.

Prieš įterpiant ekstraktus į kukurūzų silosuojamą masę, atliktas ekstraktų slopinančios koncentracijos nustatymas skiedimo metodu, remiantis NCCLS standartu. Skiedimo metodas naudotas nustatyti čiobrelis ir raudonėlio ekstraktų slopinančią koncentraciją, dažniausiai silosuojamuose pašaruose aptinkamoms mikroskopinių grybų rūšims *A. fumigantus* ir *A. niger*.

Čiobrelis ir raudonėlio vandeniniai ekstraktai (50,0 g smulkintos augalų masės sumaišyta su 200,0 ml distiliuoto vandens) ir etanoliniai ekstraktai (50,0 g smulkintos augalų masės sumaišyta su 200,0 ml 70° maistiniu etilo alkoholiu) po 100 µl buvo sumaišyti su 100 µl mikroorganizmų suspensijo-

mis steriliuose 24 šulinėlių plokštelėse. Kontrolei naudotas sterilus distiliuotas vanduo ir mikroorganizmai. Mikroorganizmų suspensijos paruoštos pagal MacFarland vieneto optinio tankio standartą. Laikyta 30 °C temperatūroje 24 val. Tuomet 100 µl suspensija buvo įpilta į sterilią Petri lėkštelę ir užpilta SA, inkubuota 72 val. 26 °C temperatūroje. Nustatytas mikroskopiinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius.

Tyrimams kaip žaliava buvo pasirinktas kukurūzas. Nupjauta ir susmulkinta masė buvo gerai išmaišyta, suslėgta ir silosuota 3 litrų mini-siloso talpose, pasirinkus tokį santykį: 20 ml augalų ekstraktų – 1 kg žaliavos (kiekvienam ekstraktui atskirai).

Augalų ekstraktų paruošimas:

R-VE-50 – 20,0 ml raudonėlio vandeninis ekstraktas (50 g raudonėlio ir 200,0 ml distiliuoto vandens);

R-VE-25 – 20,0 ml raudonėlio vandeninis ekstraktas (25 g raudonėlio ir 200,0 ml distiliuoto vandens);

R-EE-50 – 20,0 ml raudonėlio etanolinis ekstraktas (50 g raudonėlio ir 200,0 ml 70,0 proc. maistinio etilo alkoholio);

R-EE-25 – 20,0 ml raudonėlio etanolinis ekstraktas (25 g raudonėlio ir 200,0 ml 70,0 proc. maistinio etilo alkoholio);

C-VE-50 – 20,0 ml čiobrelės vandeninis ekstraktas (50 g čiobrelės ir 200,0 ml distiliuoto vandens);

C-VE-25 – 20,0 ml čiobrelės vandeninis ekstraktas (25 g čiobrelės ir 200,0 ml distiliuoto vandens);

C-EE-50 – 20,0 ml čiobrelės etanolinis ekstraktas (50 g čiobrelės ir 200,0 ml 70,0 proc. maistinio etilo alkoholio);

C-EE-25 – 20,0 ml čiobrelės etanolinis ekstraktas (25 g čiobrelės ir 200,0 ml 70,0 proc. maistinio etilo alkoholio);

KV – 20,0 ml kontrolė su distiliuotu vandeniu;

KS – 20,0 ml kontrolė su 70 proc. maistiniu etilo alkoholiu.

Taip pat buvo pagamintas silosas, įterpiant du komercinius priedus, kaip teigiamą kontrolę, atskirai (siloso inokuliantai) (kurių sudėtyje šios bakterijos: I priedas (KG): *L. plantarum*, *E. faecium*, *P. acidilactici* ir II priedas (KC): *L. plantarum*, *P. acidilactici*, ksilanazė). Tokiu pat principu buvo pagamintas ir kontrolinis silosas (K), nieko neįterpiant. Kiekvienam ekstraktui ir kontrolei pagaminta po 2 mini siloso talpas. Siloso talpos buvo hermetiškai uždarytos ir laikomis +20 °C temperatūroje 90 dienų. Silosavimo metodika laboratorinėmis sąlygomis atlikta remiantis pakoreguotomis Tayel ir kt., Jatkauskas ir kt. metodikomis.

Atidarius siloso talpas, paimti siloso mėginiai (n = 26) cheminei analizei, fermentacijos parametrams, mikrobiologinei būklei ir mikotoksinų koncentracijoms nustatyti pagal 2.3–2.5 skyriuose pateiktas metodikas.

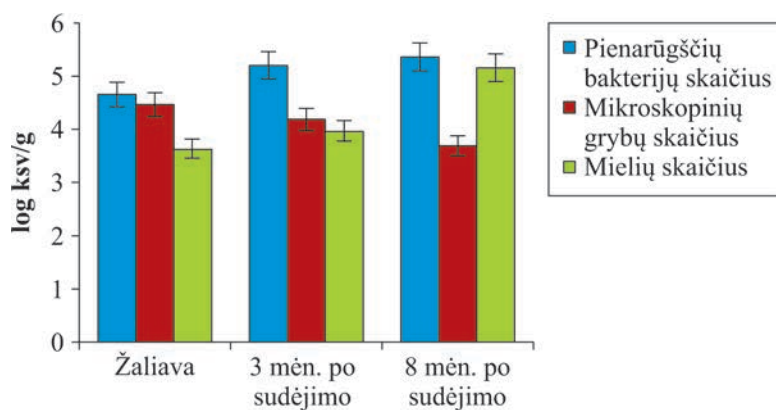
2.9. Statistinis duomenų įvertinimas

Tyrimų duomenys apdoroti „IBM SPSS Statistic 22.0“ statistiniu duomenų paketu ir „Microsoft Excel 2010“ programa. Apskaičiuoti duomenų aritmetiniai vidurkiai ($\bar{X}$), vidurkių paklaidos (SE), santykinis standartinis nuokrypis (SSN). Ryšiui tarp kintamųjų rodiklių įvertinti buvo skaičiuotas Pirsono koreliacijos koeficientas (r). Skirtumui tarp grupių patikimumo kriterijui (p) nustatyti taikytas Stjudento daugybinio palyginimo metodas. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

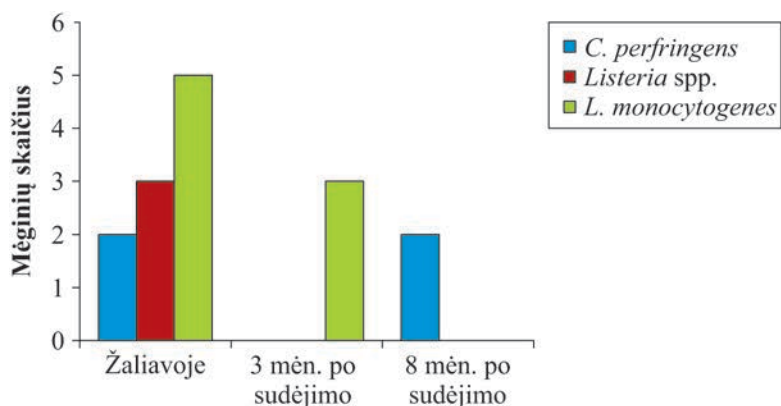
3.1. Kukurūzų žaliavos ir iš jos pagaminto siloso, paimto skirtingais laikotarpiais po sudėjimo, higieninė kokybė, užterštumas mikroskopiniais grybais, mikotoksinais, biogeniniais aminais

Kukurūzų žaliavos ir iš jos pagaminto siloso, surinkto iš skirtingų ūkių, vyrausi epifitinė ir saprofitinė mikroflora, priklausomai nuo laikotarpio po sudėjimo pateikiama 3.1.1 pav. Tirtų žaliavų ir siloso cheminiai, fermentaciniai rodikliai pateikti PUBLIKACIJA II, 1 lentelė.



3.1.1 pav. Kukurūzų žaliavoje ir iš jos pagamintame silose vyrausi epifitinė ir saprofitinė mikroflora

Nustatytas statistiškai patikimas didžiausias pienarūgščių bakterijų kiekis mėginiuose, paimtuose 8 mėn. po siloso sudėjimo. Mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius sumažėjo 17,49 proc. ($p < 0,05$) mėginiuose, paimtuose 8 mėnesiai po sudėjimo, tačiau mielių skaičius padidėjo 42,27 proc. ($p < 0,05$).



3.1.2 pav. Kukurūzų žaliavos ir siloso užterštumas nepageidaujama mikroflora

Mūsų tyrimų metu kukurūzų žaliavoje iš nustatytos nepageidaujamos mikrofloros (3.1.2 pav.), didžiausias procentas aptiktas *L. monocytogenes*. Atliktų tyrimų metu *L. monocytogenes* buvo išskirta iš 25 proc. kukurūzų žaliavos mėginių prieš fermentaciją ir iš 15 proc. mėginių, paimtų 3 mėn. po siloso sudėjimo. Kukurūzų siloso mėginiuose, paimtuose 8 mėn. po sudėjimo, šių nepageidaujamų mikroorganizmų – nenustatyta. Žalios masės prieš fermentaciją, kurioje aptikta *L. monocytogenes*, pH 4,80–5,92. Siloso mėginiuose, kuriuose nustatyta *L. monocytogenes*, pH 3,48–4,87.

C. perfringens aptikta 2 proc. žaliavoje, kurios pH įvairavo nuo 4,55 iki 6,04 ir 2 proc. mėginių – 8 mėn. po sudėjimos, kurių – pH 4,30.

3.1.1 lentelė. Vyraujančios mikroskopinių grybų rūšys bei kiti mikroorganizmai kukurūzų žaliavoje ir iš jo pagamintame silose

Mikroorganizmai	Aptikimo dažnis proc.			p
	Žaliavoje	3 mėn. po sudėjimo	8 mėn. po sudėjimo	
<i>Acremonium spp.</i>	0,42±0,42	0,43±0,31	0	0,721
<i>Acremoniella spp.</i>	3,42±0,93	2,70±1,31	0	0,145
<i>Alternaria spp.</i>	77,17±7,86 ^a	0,09±0,09 ^b	0	0,000
<i>Aspergillus spp.</i>	0,71±0,62 ^a	32,75±7,06 ^b	57,51±13,21 ^c	0,000
<i>A. niger</i>	7,74±5,37	18,37±7,99	2,19±1,11	0,253
<i>A. fumigatus</i>	4,34±4,06 ^a	12,17±4,55 ^{a,b}	27,75±7,95 ^b	0,017
<i>A. flavus</i>	0,14±0,14	0,88±0,41	0,55±0,37	0,211
<i>A. parasiticus</i>	0,69±0,44	1,16±0,61	1,10±0,47	0,786
<i>A. eurotium</i>	1,58±1,22	1,30±1,30	0,55±0,37	0,868

3.1.1 lentelės tęsinys

Mikroorganizmai	Aptikimo dažnis proc.			p
	Žaliavoje	3 mėn. po sudėjimo	8 mėn. po sudėjimo	
<i>Byssoschlamys nivea</i>	0	3,36±2,01	3,87±1,07	0,111
<i>Monascus ruber</i>	0	1,68±1,01	1,94±0,54	0,122
<i>Cladosporium</i> spp.	5,50±2,14 ^a	0	0,56±0,56 ^b	0,017
<i>Fusarium</i> spp.	37,54±5,81 ^a	0,43±0,43 ^b	0	0,000
<i>Geotrichum</i> spp.	0,14±0,14	0,57±0,27	0,83±0,43	0,186
<i>Penicillium</i> spp.	0,89±0,61 ^a	25,36±6,35 ^b	7,22±4,60 ^a	0,000
<i>Rhizopus</i> spp.	1,08±0,59	0,72±0,41	1,05±0,71	0,866
<i>Mucor</i> spp.	24±7,21 ^a	2,46±0,84 ^b	50±15,08 ^c	0,001
<i>Trichoderma</i> spp.	0,55±0,32 ^a	6,47±2,99 ^b	0	0,048
<i>Trichoteceum</i> spp.	0,08±0,08 ^a	0	0	0,06
Pienarūgščių bakterijų skaičius, log ksv/g	4,65±0,5 ^a	5,20±0,04 ^b	5,35±0,04 ^c	0,000
Mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius, log ksv/g	4,46±0,08 ^a	4,17±0,11 ^b	3,68±0,16 ^c	0,000
Mielių skaičius, log ksv/g	3,62±0,35 ^a	3,96±0,28 ^a	5,15±0,11 ^b	0,011

Skirtingos raidės ^{a,b,c} rodo patikimą skirtumą ($p<0,05$) tarp mėginių toje pačioje eilutėje.

Keturiolika skirtingų filamentinių mikroskopinių grybų genčių aptikta kukurūzų žaliavoje ir iš jo pagamintame silose (3.1.1 lentelė). *Fusarium* spp. statistiškai patikimas ($p<0,05$) didesnis kiekis nustatytas kukurūzų siloso žaliavoje nei siloso mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po siloso sudėjimo. Žaliavoje vyravo šios *Fusarium* spp. rūšys: *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. culmorum*. Šios genties mikroskopinių grybų neaptikta pašaruose, paimtuose 8 mėn. po sudėjimo. Išskirtos ir identifikuotos 6 *Aspergillus* rūšys, tarp kurių nustatyta ir *A. niger*. Ši rūšis dominavo siloso mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo ($p>0,05$). Siloso mėginiuose, paimtuose 8 mėn. po sudėjimo, nustatytas didžiausias *A. fumigatus* ($p<0,05$), lyginat su kiekiu aptiktu žaliavoje. Siloso mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo, nustatytas didžiausias mėginių užterštumas *Penicillium* spp. Vyravo šios *Penicillium* mikromicetų rūšys: *P. verrucosum*, *P. roqueforti*, *P. griseofulvum*.

3.1.2 lentelė. Mikotoksinai ($\mu\text{g/kg}$) kukurūzų žaliavoje ir silose

Mikotoksinai		Laikotarpis		
		Žaliava	3 mėn. po sudėjimo	8 mėn. po sudėjimo
ZEA	n ¹	20	20	12
	Teig ²	100	100	100
	Vid. konc. ³	236,85±31,51 ^a	880,40±60,62 ^b	402,25±40,1 ^b
	Min.-Max. konc. ⁴	50–600	100–1300	262–700
DON	n ¹	20	20	12
	Teig ²	95	100	100
	Vid. konc. ³	1640±240 ^b	2600±260 ^a	610±170 ^c
	Min.-Max. konc. ⁴	18,5–3500	480–5300	100–920
T-2/HT-2	n ¹	20	20	20
	Teig ²	45	100	100
	Vid. konc. ³	40,21±18,23 ^b	141,48±23,37 ^a	147,25±20,8 ^a
	Min.-Max. konc. ⁴	20–325	16–94	28–226
AF (bendrai)	n ¹	20	20	12
	Teig ²	10	80	75
	Vid. konc. ³	0,94±0,51 ^b	16,86±3,96 ^a	20,05±5,33 ^a
	Min.-Max. konc. ⁴	<0,002–6,6	<0,002–62,3	<0,002–47,5
OTA	n ¹	–	12	12
	Teig ²	–	100	100
	Vid. konc. ³	–	29,15±5,60 ^a	18,95±4,86 ^a
	Min.-Max. konc. ⁴	–	2,5–60	2,5–58
Gliotoksinas ⁵	n ¹	–	21	13
	Teig ²	–	71,43	69,23
	Vid. konc. ³	–	–	–
	Min.-Max. konc. ⁴	–	–	–

¹n – mėginių skaičius; ²teigiamų mėginių procentas; ³visų mėginių vidutinė mikotoksino koncentracija ($\mu\text{g/kg}$); ⁴minimali-maksimali mikotoksino koncentracija ($\mu\text{g/kg}$); ⁵nustatyta kokybiškai. Skirtingos raidės ^{a,b,c} rodo patikimą skirtumą ($p<0,05$) tarp mėginių toje pačioje eilutėje.

Mikotoksinai ZEA ir DON aptikti visuose kukurūzų siloso mėginiuose (3.1.2 lentelė). DON siloso žaliavoje aptiktas – 95 proc. tirtų mėginių. Vidutinė didžiausia DON koncentracija aptikta mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo, t. y. 58,54 proc. ($p<0,05$) daugiau nei žaliavoje. Mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po sudėjimo, nustatyta mažiausia vidutinė DON koncentracija, t. y. 62,8 proc. ($p<0,05$) mažiau nei žaliavoje ir 76,54 proc. ($p<0,05$) mažiau nei mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo.

Vidutinė didžiausia ZEA koncentracija nustatyta mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo, t. y. 3,7 kartų ($p<0,05$) daugiau, o mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po sudėjimo, 1,6 katų ($p<0,05$) daugiau nei žaliavoje.

T-2/HT-2 vidutinė didžiausia mikotoksinų koncentracija nustatyta mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po sudėjimo, t. y. 3,7 kartų ($p < 0,05$), o mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo, 3,5 ($p < 0,05$) daugiau nei žaliavoje.

AF (bendrai) mažiausia vidutinė koncentracija nustatyta žaliavoje, o didžiausia siloso mėginiuose, paimtuose 8 mėn. po sudėjimo. Vidutinė didžiausia OTA koncentracija nustatyta siloso mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo, t. y. 53 proc. ($p > 0,05$) daugiau nei mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po sudėjimo.

Glitoksinas nustatytas 70 proc. mėginių. Analizės metu buvo pastebėtas ir kitų spalvų švytėjimas, kas galėtų rodyti, kad tirtuose mėginiuose yra ir kitų toksinų (kaip fumigaclavinas ar fumitremorgenas), tačiau mes jų vertinti negalime be tyrimams reikalingų standartų.

3.1.3 lentelė. Biogeniniai aminorūgščių (mg/kg) kukurūzų silose

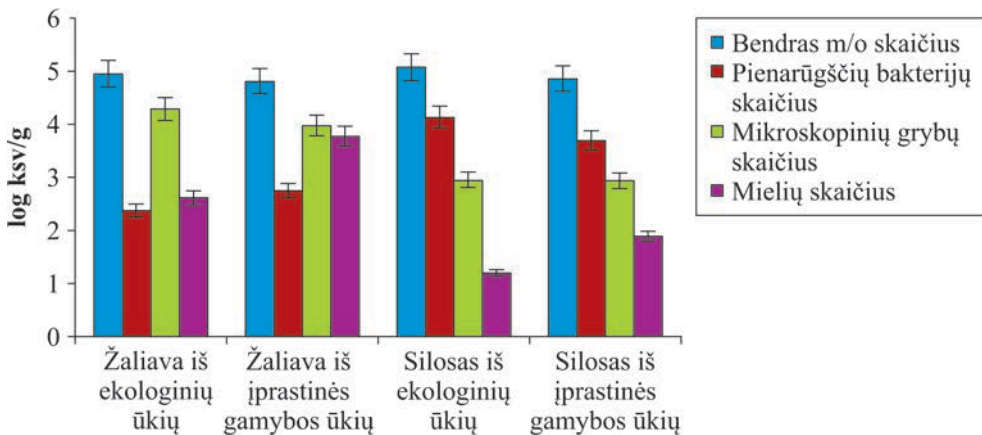
Biogeniniai aminorūgščių		Laikotarpis	
		3 mėn. po sudėjimo	8 mėn. po sudėjimo
Histaminas	n ¹	12	12
	Teig ²	100	100
	Vid. konc. ³	13,41±4,12	8,98±5,07
	Min.-Max. konc. ⁴	0–41,91	0–62,78
Tiraminas	n ¹	12	12
	Teig ²	100	100
	Vid. konc. ³	114,10±20,14	81,58±27,13
	Min.-Max. konc. ⁴	36,41–217,64	5,69–303,83
Putrescinas	n ¹	12	12
	Teig ²	100	100
	Vid. konc. ³	191,38±26,65	149,91±37,65
	Min.-Max. konc. ⁴	70,91–327,66	37,33–507,77
Kadaverinas	n ¹	12	12
	Teig ²	100	100
	Vid. konc. ³	898,22±248,65	633,57±328,23
	Min.-Max. konc. ⁴	74,54–2586,97	23,36–4124,61

¹n – mėginių skaičius; ²teigiamų mėginių procentas; ³visų mėginių vidutinė mikotoksino koncentracija (μg/kg); ⁴minimali-maksimali mikotoksino koncentracija (μg/kg).

Atliktų tyrimų metu visuose kukurūzų siloso mėginiuose aptikta biogeninių aminorūgščių (3.1.3 lentelė). Nustatytos histamino mažiausios, o kadaverino – didžiausios koncentracijos. Mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo, nustatytos didesnės biogeninių aminorūgščių koncentracijos nei mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po sudėjimo (PUBLIKACIJA II).

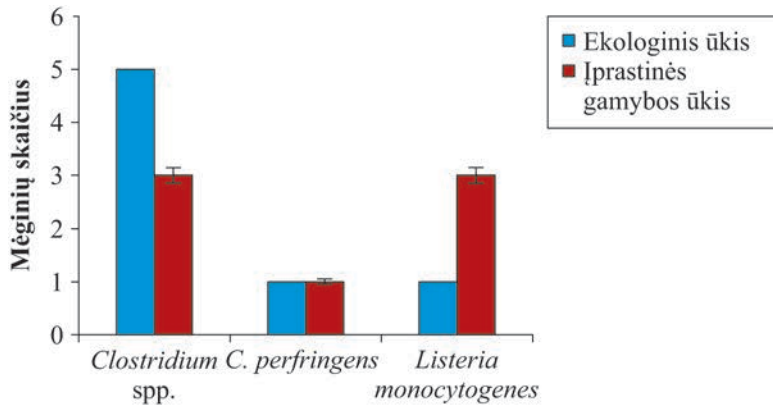
3.2. Daugiamečių žolių ir iš jų pagamintų bei į ritinius susuktų silosuotų pašarų iš ekologinių ir įprastinės gamybos ūkių higieninė kokybė, užterštumas mikroskopiniais grybais, mikotoksinais, biogeniniais aminais

Daugiamečių žolių ir iš jų pagamintuose į ritinius susuktuose silosuotuose pašaruose, surinktuose iš ekologinių ir įprastinės gamybos ūkių, vyrausi epifitinė ir saprofitinė mikroflora, priklausomai nuo silosavimo trukmės, pateikta 3.2.1 paveiksle. Tirtų žaliavų ir iš jų silosuotų pašarų cheminiai, fermentaciniai rodikliai pateikti PUBLIKACIJA III, 1 lentelė.



3.2.1 pav. Daugiamečių žolių ir iš jų pagamintuose silosuotose pašaruose vyraujanti epifitinė ir saprofitinė mikroflora

Iš ekologinių ūkių prieš silosavimą surinktų mėginių užterštumas mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius siekė 4,27 log ksv/g ($p > 0,05$) ir nustatytas 7,82 proc. didesnis negu daugiamečių žolės mėginiuose, paimtuose iš įprastinės gamybos ūkių. Nustatyta, kad mėginiuose iš ekologinių ūkių bendras mikroorganizmų skaičius 2,92 proc. ($p > 0,05$) didesnis negu įprastinės gamybos ūkiuose. Pienarūgščių bakterijų ir mielių kiekis buvo nustatyti didesni įprastinės gamybos ūkiuose, atitinkamai 16 proc. ($p < 0,05$) ir 44,23 proc. ($p > 0,05$). Silosuotame pašare, susuktame į ritinius, 4,55 proc. ($p > 0,05$) ir 11,68 proc. ($p < 0,05$) didesnis bendras mikroorganizmų skaičius ir pienarūgščių bakterijų skaičius nustatytas mėginiuose, paimtuose iš ekologinių ūkių, mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius abiejuose ūkiuose skyrėsi labai neženkliai. Mielių skaičius 57,98 proc. ($p > 0,05$) didesnis įprastinės gamybos ūkių siloso mėginiuose.



3.2.2 pav. Į ritinius silosuotų daugiamečių žolių užterštumas nepageidaujama mikroflora

L. monocytogenes nustatyta 15 proc. siloso mėginių iš įprastinės gamybos ūkių ir 5 proc. – iš ekologinių ūkių (3.2.2 pav.).

Clostridium spp. nustatyta 25 proc. mėginių iš ekologinių ūkių 15 proc. iš įprastinės gamybos ūkių. *C. perfringens* – po 5 proc. mėginių iš abiejų ūkių.

3.2.1 lentelė. Vyraujantys mikroskopiniai grybai bei kiti mikroorganizmai daugiamečių žolių mėginiuose ir į ritinius susuktuose silosuotuose pašaruose iš ekologinių ir įprastinės gamybos ūkių

Mikroorganizmai	Aptikimo dažnis, proc.				p
	Žaliava prieš fermentaciją. Ekologinis ūkis	Silasas 8 mėn. po susukimo. Ekologinis ūkis	Žaliava prieš fermentaciją. Įprastinės gamybos ūkis	Silasas 8 mėn. po susukimo. Įprastinės gamybos ūkis	
<i>Acremoniella</i> spp.	0,35±0,35	1,17±0,81	0,55±0,4	3,19±3,05	0,666
<i>Alternaria</i> spp.	43,82±6,22	0	36,37±6,66	0	0,419
<i>Aspergillus</i> spp.	1,74±0,73 ^a	24,90±6,13 ^b	1,84±0,94 ^a	16,25±6,49 ^b	0,003
<i>A. niger</i>	1,22±0,63	4,32±1,55	1,75±0,78	2,49±1,08	0,229
<i>A. flavus</i>	0,17±0,17	0,66±0,3	0,18±0,18	0,66±0,3	0,315
<i>A. fumigatus</i>	0	8,32±1,97	0	2,64±1,38	0,024
<i>A. parasiticus</i>	0	0,66±0,3	0	5,41±4,23	0,312
<i>Byssoschlamys nivale</i>	0	7,18±5,31	0	3,69±1,76	0,538
<i>Trichoderma</i> spp.	0	0,66±0,39	0	0,69±0,34	0,958

3.2.1 lentelės tęsinys

Mikroorganizmai	Aptikimo dažnis, proc.				p
	Žaliava prieš fermentaciją. Ekologinis ūkis	Silosas 8 mėn. po susukimo. Ekologinis ūkis	Žaliava prieš fermentaciją. Įprastinės gamybos ūkis	Silosas 8 mėn. po susukimo. Įprastinės gamybos ūkis	
<i>Cladosporium</i> spp.	20,33±5,40	0	15,91±4,73	0	0,543
<i>Fusarium</i> spp.	38,05±6,06	0	36,45±7,8	0	0,873
<i>Geotrichum</i> spp.	0	1,04±0,51	0	1,10±0,53	0,938
<i>Monascus ruber</i>	0	6,48±5,21	0	2,76±1,35	0,498
<i>Verticillium</i> spp.	3,50±1,68	0	5,92±2,74	0	0,451
<i>Ulocladium</i> spp.	0,87±0,71	0	0,37±0,25	0	0,515
<i>Rhizopus</i> spp.	8,06±5,45	1,33±0,7	1,11±0,93	1,59±0,84	0,219
<i>Penicillium</i> spp.	0,17±0,17 ^b	15,66±6,75 ^a	0,37±0,25 ^b	7,36±4,30 ^{a,b}	0,040
<i>Mucor</i> spp.	11,57±4,62 ^{a,b}	6,34±5,02 ^{a,b}	15,72±6,42 ^a	0,40±0,29 ^b	0,067
<i>Mucor hiemalis</i>	1,75±1,75	2,41±2,41	1,49±0,88	0,13±0,13	0,681
Bendras bakterijų skaičius, log ksv/g	4,93±0,08	5,05±0,11	4,79±0,09	4,83±0,13	0,288
Pienarūgščių bakterijų skaičius, log ksv/g	2,36±0,22 ^b	4,11±0,15 ^a	2,74±0,16 ^b	3,68±0,14 ^c	0,000
Mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius, log ksv/g	4,27±0,07 ^a	2,93±0,22 ^b	3,96±0,28 ^a	2,92±0,14 ^b	0,000
Mielių skaičius, log ksv/g	2,60±0,55 ^b	1,19±0,34 ^a	3,75±0,45 ^b	1,88±0,43 ^a	0,001

Skirtingos raidės ^{a, b, c} rodo patikimą skirtumą ($p < 0,05$) tarp mėginių toje pačioje eilutėje.

Daugiamečių miglinių ir pupinių žolių mėginiuose iš ekologinių ir įprastinės gamybos ūkių vyravo *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* ir kt. mikroskopinių grybų gentys (3.2.1 lentelė). Išskirtos galimai toksiškos *Fusarium* rūšys: *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *Aspergillus* rūšys: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Penicillium* rūšys: *P. verrucosum*, *P. commune*, *P. roqueforte* ir kitos.

Iš žolių žaliavos mėginių daugiausiai išskirta *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* mikroskopinių grybų genčių. Lyginat žaliavos užsikrėtimą gali- mai toksikogeniniais mikroskopiniais grybais tarp ekologinių ir įprastinės

gamybos ūkių, *Fusarium* spp. 4,44 proc. ($p>0,05$), 20,48 proc. ($p>0,05$) *Alternaria* spp., 5,75 ($p>0,05$) *Aspergillus* spp. didesnis kiekis nustatytas mėginiuose, paimtuose iš ekologinių ūkių. Siloso mėginiuose iš galimai toksikogeninių mikroskopinių grybų genčių nustatyta *Penicillium* spp. 53 proc. ($p>0,05$), *Aspergillus* spp. – 53,23 proc. ($p>0,05$) didesnis kiekis nustatytas mėginiuose iš ekologinių ūkių.

3.2.2 lentelė. Mikotoksinių ($\mu\text{g/kg}$) koncentracijos daigiamiačių žolių mėginiuose ir į ritinius susuktuose silosuotuose pašaruose iš ekologinių bei įprastinės gamybos ūkių

Mikotoksinai		Ekologiniai ūkiai		Įprastinės gamybos ūkiai	
		Žaliava ^a	Silosas ^b	Žaliava ^c	Silosas ^d
ZEA	n ¹	20	20	20	20
	Teig ²	60	100	70	100
	Vid. konc. ³	203±64,69 ^b	391±18,97	361±100,51	338,80±41,72
	Min.-Max. konc. ⁴	0–530	275–480	0–670	135–520
DON	n ¹	20	20	20	20
	Teig ²	80	100	60	100
	Vid. konc. ³	215±54,29 ^c	188,60±34,03 ^{c,d}	105±32,87 ^{a,b,d}	327,50±45,83 ^{c,b}
	Min.-Max. konc. ⁴	0–500	16–300	0–250	125–625
T-2/HT-2	n ¹	netirta	10	netirta	10
	Teig ²		100		100
	Vid. konc. ³		112,30±13,47		110,30±11,87
	Min.-Max. konc. ⁴		59–193		82–178
AF (bendras)	n ¹	20	20	20	20
	Teig ²	50	100	40	95
	Vid. konc. ³	1,04±0,50 ^{b,d}	32,54 ±7,36 ^{a,c}	0,90±0,39 ^{b,d}	27,35±6,79 ^{a,c}
	Min.-Max. konc. ⁴	0–4,7	0–70	0–3	0–65
Gliotoksinas ⁵	n ¹		15		12
	Teig ²		60		50
	Vid. konc. ³				
	Min.-Max. konc. ⁴				

¹n – mėginių skaičius; ²teigiamų mėginių procentas; ³visų mėginių vidutinė mikotoksino koncentracija ($\mu\text{g/kg}$); ⁴minimali-maksimali mikotoksino koncentracija ($\mu\text{g/kg}$); ⁵nustatyta kokybiškai. Skirtingos raidės ^{a,b,c,d} rodo patikimą skirtumą ($p<0,05$) tarp mėginių toje pačioje eilutėje.

Fuzariotoksinai ZEA, DON, T-2/HT-2 nustatyti skirtingomis koncentracijomis ekologiniuose ir intensyviuose ūkiuose daugiamačių žolių mėginiuose ir į ritinius susuktuose silosuotuose pašaruose (3.2.2 lentelė).

16,67 proc. daugiau žaliavos mėginių iš įprastinių ūkių, lyginat su ekologiniais ūkiais, aptikta mikotoksino – ZEA, vidutinė jo koncentracija 77,83 proc. ($p>0,05$) buvo didesnė nei mėginiuose iš ekologinių ūkių. Didesnė 33,33 proc. ($p<0,05$) DON koncentracija nustatyta žaliavoje iš ekologinių ūkių. AF (bendrai) koncentracija skyrėsi labai neženkliai ($p>0,05$).

Siloso mėginiuose iš ekologinių ūkių ZEA koncentracija nustatyta 13,40 proc. didesnė nei iš įprastinių ūkių. Abiejų sistemų ūkiuose T-2/HT-2 koncentracija tarp ūkių skyrėsi neženkliai ($p>0,05$). AF (bendrai) 16 proc. ($p>0,05$) didesnė koncentracija nustatyta siloso mėginiuose iš ekologinių ūkių. DON užteršti 100 proc. mėginių. 42,40 proc. ($p<0,05$) didesnė šio toksino koncentracija nustatyta mėginiuose iš įprastinių ūkių, šiuose mėginiuose nustatyta maksimali koncentracija – 625 $\mu\text{g/kg}$.

3.2.3 lentelė. *Biogeninių aminorūgščių (mg/kg) koncentracijos daugiamačių žolių mėginiuose ir į ritinius susuktuose silosuotuose pašaruose iš ekologinių bei įprastinės gamybos ūkių*

Biogeniniai aminai		Ekologiniai ūkiai	Įprastiniai ūkiai
Histaminas	n ¹	10	10
	Teig ²	90	90
	Vid. konc. ³	6,65±2,23 ^a	12,36±6,57 ^b
	Min.-Max. konc. ⁴	0–22,62	0–69,64
Tiraminas	n ¹	10	10
	Teig ²	100	100
	Vid. konc. ³	119,56±49,78 ^a	98,26±21,83 ^b
	Min.-Max. konc. ⁴	6,30–521,5	4,10–220,69
Putrescinas	n ¹	10	10
	Teig ²	90	100
	Vid. konc. ³	111,51±46 ^a	123,62±35,11 ^b
	Min.-Max. konc. ⁴	0–465,88	13,81–336,59
Kadaverinas	n ¹	10	10
	Teig ²	100	100
	Vid. konc. ³	1422,99±696,87 ^a	1722,52±504,2 ^b
	Min.-Max. konc. ⁴	32,54–6636,96	33,30–4787,24

n¹ – mėginių skaičius; Teig.² – teigiamų mėginių procentas; Vid. konc.³ – visų mėginių mikotoksinų vidutinė koncentracija ($\mu\text{g/kg}$); Max. konc.⁴ – Minimali ir maksimali mikotoksinų koncentracija ($\mu\text{g/kg}$). Skirtingos raidės ^{a,b} rodo patikimą skirtumą ($p<0,05$) tarp mėginių toje pačioje eilutėje.

Biogeniniai aminai – histaminas, tiraminas, putrescinas ir kadaverinas – nepageidaujami junginiai, aptinkami silosuotose pašaruose. Histaminas aptiktas 90 proc. mėginių abiejų kategorijų ūkiuose, tačiau 85 proc. ($p < 0,05$) didesnė koncentracija nustatyta siloso mėginiuose iš įprastinės gamybos ūkių (3.2.3 lentelė). Putrescino ir kadaverino didesnės koncentracijos taip pat aptiktos silso mėginiuose iš ekologinių ūkių, atitinkamai 10,80 proc. ($p < 0,05$) ir 21,05 proc. ($p < 0,05$). Tiramino 17,82 proc. ($p < 0,05$) didesnė koncentracija aptikta siloso mėginiuose iš ekologinių ūkių.

3.3. Mikroskopinių grybų identifikavimas ir jų toksiškumo nustatymas PGR metodu

Taikant molekulinės biologijos – PGR metodą, nustatyta, kad iš 16 – *Fusarium* spp. vyravo: *F. sporotrichioides* – 43,75 proc., *F. poae* – 12,5 proc., *F. graminearum* – 18,75 proc. (3.3.1 lentelė). Tyrimo metu, panaudojus oligonukleotidų seką – *TRI5* – nustatyta, kad 56,25 proc. šios genties mikroskopinių grybų atsakingi už trichotecenų sintezę. Taip pat, panaudojus pradžmenis – *apa2*, *omt1*, nustatyta, kad – 28,57 proc. tirtų *Aspergillus* kultūrų atsakingos už aflatoksinų gamybą. *Aspergillus* spp. ir *Penicillium* spp. genčių nepavyko diferencijuoti iki rūšių PGR metodu.

3.3.1 lentelė. Mikroskopinių grybų identifikavimas ir jų toksiškumo nustatymas PGR metodu

Mėginio Nr.	Mikroskopinio grybo gentis ir rūšis	Pradmuo					
		<i>Tri6</i>	<i>Tri7DON</i>	<i>Tri13DON</i>	<i>TRI5</i>	<i>apa2</i>	<i>omt1</i>
1.	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	+	–	–	+	–	–
2.	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	–	–	–	+	–	–
3.	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	+	–	–	+	–	–
4.	<i>Fusarium</i> spp.	–	–	–	–	–	–
5.	<i>Fusarium graminearum</i>	+	–	–	+	–	–
6.	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	+	–	–	+	–	–
7.	<i>Fusarium</i> spp.	–	–	–	–	–	–
8.	<i>Fusarium graminearum</i>	+	–	–	+	–	–
9.	<i>Fusarium graminearum</i>	+	+	+	+	–	–
10.	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	+	–	–	–	–	–
11.	<i>Fusarium</i> spp.	–	–	–	–	–	–

3.3.1 lentelės tęsinys

Mėginio Nr.	Mikroskopinio grybo gentis ir rūšis	Pradmuo					
		Tri6	Tri7DON	Tri13DON	TRI5	apa2	omt1
12.	<i>Fusarium poae</i>	+	–	–	+	–	–
13.	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	–	–	–	–	–	–
14.	<i>Fusarium poae</i>	+	–	–	+	–	–
15.	<i>Fusarium poae</i>	+	–	–	+	–	–
16.	<i>Fusarium</i> spp.	+	–	–	–	–	–
17.	<i>Aspergillus flavus</i>	–	–	–	–	+	–
18.	<i>Aspergillus</i> spp.	–	–	–	–	–	+
19.	<i>Aspergillus</i> spp.	–	–	–	–	–	–
20.	<i>Aspergillus</i> spp.	–	–	–	–	–	–
21.	<i>Aspergillus</i> spp.	–	–	–	–	–	–
22.	<i>Aspergillus</i> spp.	–	–	–	–	–	–
23.	<i>Aspergillus</i> spp.	–	–	–	–	–	–

+ teigiama reakcija; – neigiama reakcija.

3.4. Žaliavų ir iš jų silosuotų pašarų higieninių rodiklių koreliacija su cheminiais fermentaciniais rodikliais

Mūsų atliktų tyrimų metu nustatyta žaliavų ir iš jų silosuotų pašarų higieninių rodiklių koreliacija su cheminiais fermentaciniais rodikliais.

Kukurūzų siloso cheminiai fermentaciniai rodikliai pateikti PUBLIKACIJA II, 1 lentelėje. Tirtuose mėginiuose nustatyto pH vidurkis kito nuo 3,84 (min. 3,48–max. 4,33) iki 3,93 (min. 3,6–max. 4,2), o amoniakinio azoto kiekis kito nuo 10,55 (min. 7,67–max. 13,8) iki 11,06 (min. 7,54–max. 13,79). Koreliacijos tarp mikotoksinų, aminių, higieninių rodiklių ir cheminių fermentacinių rodiklių pateiktos PUBLIKACIJA II, 2 lentelėje. Atliktų tyrimų metu nustatytos silpnos, nepatikimos koreliacijos tarp atskirų mikotoksinų koncentracijos ir sausos medžiagos kiekio. Tik DON ir sausos medžiagos kiekio siloso mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po sudėjimo ($r = 0,67$, $p < 0,05$), nustatyta teigiama vidutinė koreliacija. Nustatyta stipri neigiama koreliacija tarp siloso pH ir ZEA koncentracijos ($r = -0,50$ $p < 0,05$ ir $r = -0,71$, $p < 0,05$) mėginiuose, paimtuose po 3 ir po 8 mėn. po siloso sudėjimo, bei pH ir T-2/HT-2 toksinų koncentracijos ($r = -0,82$, $p < 0,05$) mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po siloso sudėjimo.

Nustatyta stipri neigiama koreliacija tarp sausos medžiagos kiekio silose ir tiramino bei putrescino, atitinkamai ($r = 0,64$, $p < 0,05$; $r = -0,57$, $p > 0,05$) mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po siloso sudėjimo.

Daugiamečių žolių siloso mėginių iš ekologinių ir įprastinės gamybos ūkių cheminiai bei fermentaciniai rodikliai pateikti PUBLIKACIJA III, 1 lentelėje. Koreliacijos koeficientai tarp biogeninių aminių, mikotoksinų koncentracijų ir siloso cheminių fermentacinių rodiklių pateikti PUBLIKACIJA III, 2 lentelėje. Nustatyta stipri neigiama koreliacija ($p < 0,05$) tarp mikotoksinų AF (bendrai), ZEA koncentracijų ir sausųjų medžiagų kiekio bei pH. Nustatytas stipus ryšys tarp mikotoksinų DON ir T-2/HT-2 koncentracijų ir amoniako bei pieno rūgšties kiekio silose. Nustatyta stipri teigiama koreliacija tarp tiramino, putrescino, kadaverino ir amoniako, sausų medžiagų kiekio, baltymų kiekio bei sviesto rūgšties koncentracijos. Histaminas siloso mėginiuose nekoreliavo nei su vienu cheminiu ar fermentaciniu rodikliu.

3.5. Savikontrolės tikslu ir probleminiais atvejais tirtų pašarų užterštumas mikotoksinais

Savikontrolės atvejais mikotoksinų tyrimams atvežtų silosuotų pašarų iš įvairių Lietuvos ūkių (3.5.1 lentelė) vidutinės didžiausios mikotoksino AFB₁ koncentracijos nustatytos 2015 m. kukurūzų silose 1–2 mėn. po sudėjimo ir daugiamečių žolių silose (tranšėjose), o mažiausia 2013 m. kukurūzų silose – > 8 mėn. po sudėjimo. Didžiausios ZEA koncentracija nustatyta viename kukurūzų siloso mėginyje, paimtame po 1–2 mėn. po siloso sudėjimo 2014 m. Didžiausios vidutinės DON koncentracijos nustatytos kukurūzų silose – > 8 mėn. po sudėjimo 2012 m. bei daugiamečių žolių ritiniuose 1–2 mėn. po susukimo 2013 metais.

3.5.1 lentelės tęsinys

Laikotarpis	Kukurūzų silosas (tranšėjos)			Kukurūzų grūdainis			Daugiamečių žolių silosas (ritiniuose)			Daugiamečių žolių silosas (tranšėjos)		
	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON
3–7 mėn.												
n ¹	–	–	–	2	2	2	3	3	3	4	4	4
Teig ²				100	100	100	100	100	100	100	100	100
Vid. konc. ³				2±0,5	300±100	450±50	10±2	1020±190	630±140	5±1	750±9	420±40
Min.-Max. ⁴				1–2	200–400	400–500	8	670–1300	450–900	2–7	600–900	300–480
>8 mėn.												
n ¹	2	2	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Teig ²	100	100	100									
Vid. konc. ³	3,2±2	450±250	750±250									
Min.-Max. ⁴	1–0,005	0,2–0,5	0,5–1									
2013 m.												
1–2 mėn.												
n ¹	–	–	–	3	3	3	1	1	1	3	3	3
Teig ²				33,33	100	100	0	930	750	33,33	100	100
Vid. konc. ³				0,3–1	840±230	500±60				4,2±4	630±280	570±40
Min.-Max.					530–1300	400–600				300–480	300–1200	500–650
3–7 mėn.												
n ¹	–	–	–	3	3	3	–	–	–	8	8	8
Teig ²				66,67	100	100				50	100	100
Vid. konc. ³				2±1	380±60	630±90				2–0,08	320±70	300±50
Min.-Max. ⁴				0–4	300–500	500–800				0–5	50–600	12–500

3.5.1 lentelės tęsinys

Laikotarpis	Kukurūzų silosas (tranšėjos)			Kukurūzų grūdainis			Daugiamečių žolių silosas (ritiniuose)			Daugiamečių žolių silosas (tranšėjos)		
	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON
>8 mėn.												
n ¹	2	2	2				–	–	–	3	3	3
Teig ²	50	100	50							100	100	100
Vid. konc. ³	0,65±0,65	420±120	300±300							5±9	1020±10	630±190
Min.-Max. ⁴	0–1,3	300–530	0–600							4–7	870–1200	400–1000
2014 m.												
1–2 mėn.												
n ¹	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Teig ²	8	2000	750									
Vid. konc. ³												
Min.-Max. ⁴												
3–7 mėn.												
n ¹	4	4	4				2	2	2	2	2	2
Teig ²	100	100	75				100	100	100	100	100	100
Vid. konc. ³	5,8±0,09	600±70	240±100				4±1	750±50	530±180	4±0,4	850±350	630±130
Min.-Max. ⁴	4–8	500–800	0–500				3–5	700–800	350–700	4–5	500–1200	500–750
>8 mėn.												
n ¹	–	–	–				–	–	–	3	3	3
Teig ²										66,67	100	100
Vid. konc. ³										4±2	470±70	450±30
Min.-Max. ⁴										0–8	400–600	400–500

3.5.1 lentelės tęsinys

Laikotarpis	Kukurūzų silosas (tranšėjos)			Kukurūzų grūdainis			Daugiamečių žolių silosas (ritiniuose)			Daugiamečių žolių silosas (tranšėjos)		
	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON	AFB ₁	ZEA	DON
2015 m.												
1–2 mėn.												
n ¹	2	2	2	–	–	–	–	–	–	3	3	3
Teig ²	100	100	100	–	–	–	–	–	–	66,67	66,67	100
Vid. konc. ³	7,5±5	940±140	450±50							2±1	440±230	630±70
Min.-Max. ⁴	3–12	800–1070	400–500							0–4	0–800	500–750
3–7 mėn.												
n ¹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4	4	4
Teig ²	–	–	–	–	–	–	–	–	–	75	100	75
Vid. konc. ³	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7±3	790±150	350±120
Min.-Max. ⁴	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0–13	500–120	0–500
>8 mėn.												
n ¹	6	6	6	3	3	3	2	2	2	–	–	–
Teig ²	83,3	100	100	0	100	100	100	100	100	–	–	–
Vid. konc. ³	2±0,5	920±280	440±130		180±60	200±30	3±0,2	1150±150	380±130			
Min.-Max. ⁴	0–3	200–2100	100–900		100–300	150–250	3–3,3	1000–1300	250–500			

Probleminiais atvejais, kai ūkiuose atsirado ūmūs, neaiškios kilmės melžiamų karvių sveikatingumo sutrikimai, o ūkių savininkai ar veterinarijos gydytojai kaip vieną jų priežasčių įtarė pašarų užterštumą toksinais, į laboratoriją buvo pristatyta 15 mėginių. Dažniausiai pasitaikę sutrikimai – padidėjęs somatinių ląstelių kiekis – 33,3 proc. ir abortai – 33,3 proc. visų probleminių atvejų (3.5.2 lentelė).

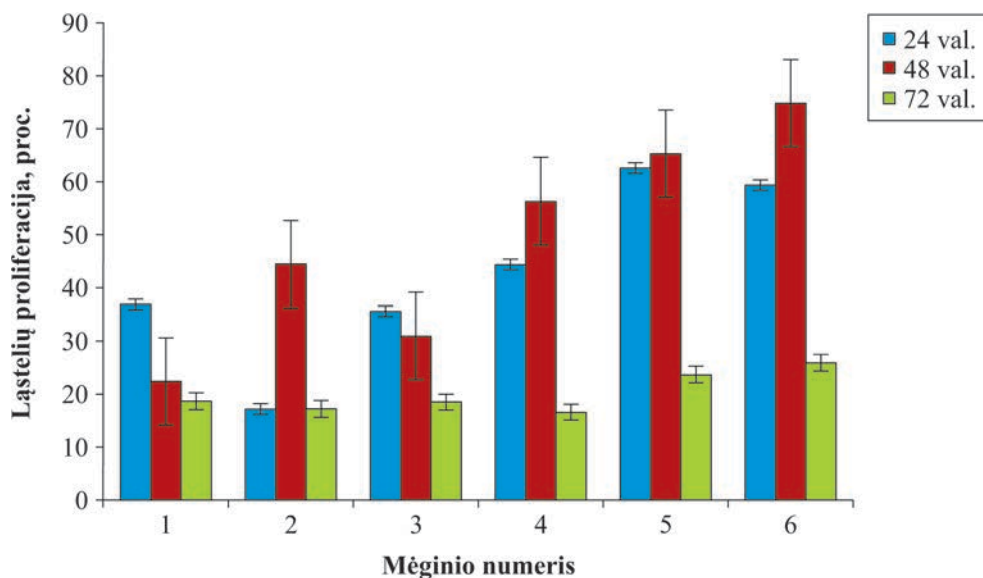
3.5.2 lentelė. Mikotoksinų koncentracijos pašaruose iš „probleminių“ ūkių

Rodikliai		Mikotoksinų koncentracija, mg/kg		
		AFB ₁	ZEA	DON
Padidėjęs somatinių ląstelių kiekis piene; n = 5	Vid. konc. ¹ Min.-Max. ²	0,0025±0,00084 0–0,005	0,64±0,17 0–1,3	0,42±0,11 0–0,75
Ūmus kojų sąnarių patinimai; n = 3	Vid. konc. ¹ Min.-Max. ²	0,0047±0,002 0,002–0,008	1,20±0,47 0,5–2,1	0,75–0,25 0,5–1
Veršingų karvių abortai; n = 5	Vid. konc. ¹ Min.-Max. ²	0,0027±0,00065 0,001–0,004	0,68±0,22 0,2–1,2	0,47±0,02 0,4–0,5
Neaiškios kilmės viduriavimas; n = 2	Vid. konc. ¹ Min.-Max. ²	0,0045±0,0005 0,004–0,005	1,1±0,1 1–1,2	0,7±0,3 0,4–1

¹visų mėginių vidutinė mikotoksino koncentracija; ²minimali-maksimali mikotoksino koncentracija.

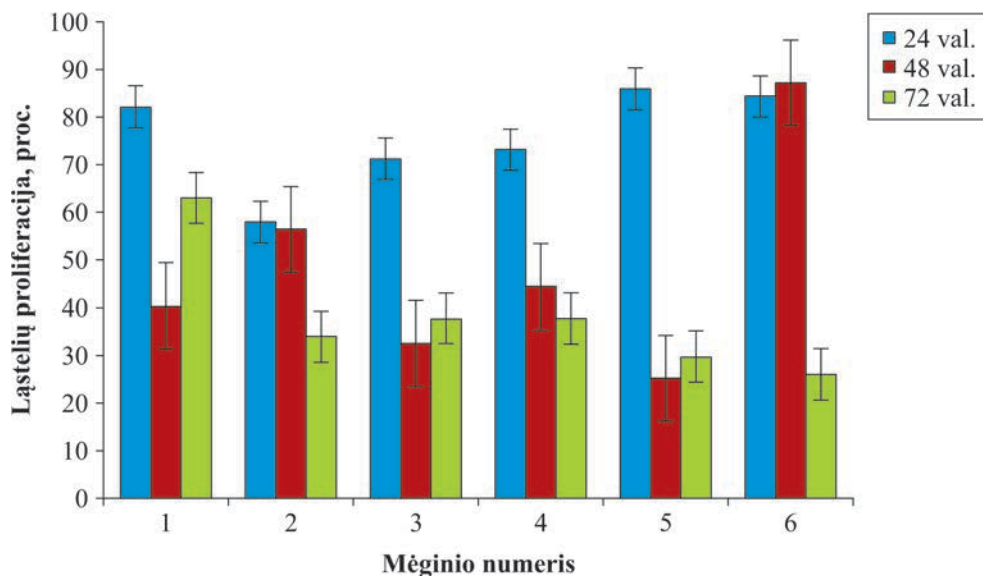
3.6. Silosuotų pašarų, užterštų mikotoksinais, bei kristalinių mikotoksinų citotoksiškumo įvertinimas organų taikinių ląstelių kultūroms

Nustatyta, kad BHL-21 ląstelių liniją paveikus 5 mėginiu (3.6.1 pav.), kurio užterštumas toksinais mažiausias (t. y. DON – 500 µg/kg ir ZEA – 130 µg/kg), nesumažino ląstelių proliferacijos daugiau kaip 50 proc., ląstelių proliferacija nesumažėjo daugiau kaip 50 proc. paveikus jas ir 6 mėginiu, kuriame nustatyta didžiausia AFB₁ ir ZEA koncentracija, tačiau DON neaptikta.



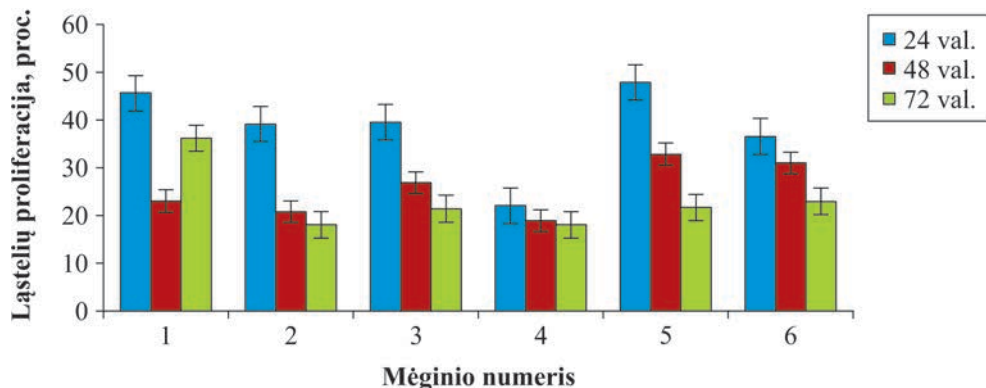
3.6.1 pav. Pašarų, užterštų DON, ZEA, AFB₁, T-2 mikotoksinais, toksinis poveikis BHL-21 ląstelių linijai

Paveikus MH-22A ląstelių liniją 24 val. pašarais (3.6.2 pav.), užterštais DON, ZEA, AFB₁, T-2 mikotoksinais, ląstelių proliferacija nesumažėjo daugiau kaip 50 proc. visuose mėginiuose. Po 48 val. stipriausias poveikis pastebėtas paveikus ląsteles 5 mėginiu ir silpniausias paveikus 6 mėginiu.



3.6.2 pav. Pašarų, užterštų DON, ZEA, AFB₁, T-2 mikotoksinais, toksinis poveikis MH-22A ląstelių linijai

Paveikus PKEL ląstelių liniją pašarais (3.6.3 pav.), užterštais DON, ZEA, AFB₁, T-2 mikotoksinais, ląstelių proliferacija, mažesnė nei 50 proc., nustatyta visais atvejais. Tačiau stipriausiu poveikiu pasireiškė 4 mėginys, kuriame nustatyta didžiausia DON koncentracija, t. y. 500 µg/kg ir AFB₁ – 3 µg/kg.



3.6.3 pav. Pašarų, užterštų DON, ZEA, AFB₁, T-2 mikotoksinais, toksinis poveikis PKEL ląstelių linijai

Atskirų kristalinių mikotoksinių DON, ZON, AFB₁ ir jų kombinacijų poveikio ląstelių apoptozei ir proliferacijai nustatyti panaudotos taikinininių organų kilmės ląstelės: HeLa, BHL-21, PKEL, MH-22A. Ląstelės paveiktos kristaliniais mikotoksinais ir jų mišiniais trimis skirtingais laikotarpiais, t. y. 24 val., 48 val., 72 val.

3.6.2 lentelė. Mikotoksinių AFB₁, ZEA, DON, ir jų mišinių poveikis ląstelių proliferacijai

Miko- toksi- nas	Koncent- racija (µg/l)	Laikas (val.)	Ląstelių linijos			
			HeLa (proc.)	BHL-21 (proc.)	PKEL (proc.)	MH-22A (proc.)
AFB ₁	8,5	24	133,28±4,79 ^a	101,25±0,83 ^a	98,15±0,7 ^a	114,77±1,27 ^a
		48	98,48±15,58 ^b	81,66±14,53 ^a	116,79±3,2 ^{a,b}	110,45±5,55 ^a
		72	103,95±4,88 ^{a,b}	78,04±4,31 ^a	53,13±23,63 ^b	101,64±14,26 ^a
DON	1250	24	67,42±3,25 ^a	68,64±6,19 ^a	85,58±4,66 ^a	98,17±3,7 ^a
		48	100±10,43 ^b	56,64±10,06 ^{a,b}	63,33±7,58 ^a	75,63±2,36 ^b
		72	111,18±15,01 ^b	40,87±1,96 ^b	50,38±5,04 ^b	63,82±0,36 ^b
ZEA	1560	24	142,89±4,94 ^a	136,83±23,32 ^a	87,38±9,56 ^b	126,89±1,85 ^a
		48	87,05±10,21 ^b	87,11±3,22 ^b	51,35±14,3 ^b	109,84±10,3 ^a
		72	76,03±6,85 ^b	75,04±7,44 ^b	109,95±5,38 ^a	101,55±11,64 ^a

3.6.2 lentelės tęsinys

Mikotoksinas	Koncentracija (µg/l)	Laikas (val.)	Ląstelių linijos			
			HeLa (proc.)	BHL-21 (proc.)	PKEL (proc.)	MH-22A (proc.)
DON/ ZEA	1250/ 1560	24	92,40±1,56 ^a	80,84±1,79 ^a	73,35±6,16 ^a	105±20,69 ^a
		48	88,52±2,18 ^a	73,24±2,62 ^a	92,48±8,89 ^a	87,87±4,1 ^a
		72	93,91±10,83 ^a	51,12±14,4 ^a	87,18±13,72 ^a	83,98±9,47 ^a
AFB ₁ / DON/ ZEA	8,5/ 1250/ 1560	24	88,33±4,57	78,19±1,21 ^a	102,36±0,4 ^a	113,13±8,02 ^a
		48	Nt	88,38±3,23 ^a	94,47±7,71 ^a	68,65±1,32 ^a
		72	Nt	80,96±1,31 ^a	Nt	43,25±1,67 ^b
AFB ₁ / ZEA	8,5/ 1560	24	87,06±5,11 ^a	75,29±18,11 ^a	105,26±2,91 ^a	94,27±3,37 ^a
		48	100,34±8,06 ^a	98,39±5,11 ^a	87,89±3,08 ^b	84,40±4,84 ^{a,b}
		72	57,88±6,17 ^b	93,97±1,2 ^a	58,15±3,15 ^c	76,55±4,79 ^b
AFB ₁ / DON	8,5/ 1250	24	85,46±2,19 ^{a,b}	78,19±1,2 ^a	110,63±11,28 ^a	96,41±3,04 ^a
		48	80,85±11,97 ^b	78,01±0,68 ^a	82,29±22,76 ^a	92,33±4,32 ^a
		72	74,99±4,81 ^a	76,23±11,18 ^a	91,98±5,52 ^a	113,42±3,15 ^b

Ląstelių proliferacija, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, trijų pakartojimų reikšmės vidurkis ± standartinis nuokrypis. Skirtingos raidės ^{a,b,c} rodo statistškai patikimą skirtumą ($p<0,05$) tarp atskirų ląstelių linijų veikiant jas mikotoksinais skirtingu laiku.

Apskaičiuojant optinio tankio vertes, naudojant MTT metodą (3.6.2 lentelė), nustatytas, AFB₁ stipriausias metabolinis aktyvumas PKEL ląstelėms po 72 val. ($p<0,05$), DON – BHL-21 ($p<0,05$) ir PKEL ($p<0,05$) ląstelių linijoms po 72 val.

Palyginus atskirų kristalinių mikotoksinų ir jų mišinių poveikį ląstelių kultūroms, nustatytas didžiausias slopinantis poveikis po 72 val. DON/ZEA – BHL-21, AFB₁/DON/ZEA – MH-22A, o AFB₁/ZEA – HeLa ir PKEL ląstelių linijoms.

Lyginat mikotoksinų slopinantį (supresinį) poveikį po 24 ir 72 val., nustatyta, kad atskiri mikotoksinai ir jų mišiniai stipriausiai veikė visas ląstelių kultūras po 72 val. Visų trijų mikotoksinų didžiausias poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui, t. y. apie 50 proc., po 72 val. ($p<0,05$), nustatytas kepenų MH-22A ląstelėms (LD₅₀). Kai AFB₁ – 8,5 µg/l, ZEA – 1560 µg/l, DON – 1250 µg/l. DON/ZEA mišinio (1250/1560 µg/l), didžiausias poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui nustatytas inkstų BHL-21 ląstelėms ($p>0,05$) po 72 val.

3.6.3 lentelė. Mikotoksinų AFB₁, DON, ZEA ir jų mišinių poveikis ląstelių apoptozei

Mikotoksinas	Koncentracija (µg/l)	Laikas (val.)	Ląstelių linijos			
			HeLa (proc.)	BHL-21 (proc.)	PKEL (proc.)	MH-22A (proc.)
AFB ₁	8,5	24	95,64±14,90 ^a	80,78±3 ^a	Nt	114,77±1,27 ^a
		48	98,48±15,58 ^a	59,80±3,49 ^b	Nt	110,46±5,55 ^a
		72	103,95±4,88 ^a	44,99±0,99 ^c	86,51±0,59	43,78±1,38 ^b
DON	1250,0	24	74,92±3,44 ^a	115,39±8,66 ^a	81,27±7,39 ^a	74,96±5,34 ^a
		48	97,75±24,24 ^a	68,93±2,63 ^b	71,81±11,25 ^a	88,08±4,31 ^a
		72	95,25±11,94 ^a	41,44±0,86 ^c	50,38±5,03 ^b	79,89±1,81 ^a
ZEA	1560,0	24	86,54±10,17 ^a	82,09±5,09 ^a	35,34±9,72	85,84±5,77 ^a
		48	92,54±8,36 ^a	90,71±4,42 ^a	111,82±11,6	86,88±2,74 ^a
		72	102,78±3,54 ^a	76,33±2,08 ^a	109,96±5,38	37,61±1,19 ^b
DON/ ZEA	1250/ 1560	24	73,82±11,60 ^a	77,76±1,27 ^{a,b}	64,74±6,61 ^a	83,66±24,18 ^a
		48	101,06±26,87 ^a	75,29±4,38 ^a	87,90±2,48 ^b	91,5±50 ^a
		72	106,38±2,5 ^b	52,93±5,3 ^b	80,18±1,54 ^b	75,13±1,89 ^a
AFB ₁ / DON/ ZEA	8,5/ 1250/ 1560	24	Nt	100,47±5,81 ^a	100,28±8,62 ^a	94,47±7,71 ^a
		48	Nt	73,82±2,81 ^{a,b}	75,96±25,7 ^b	93,14±0,67 ^a
		72	Nt	67,62±8,82 ^b	37,40±1,62 ^b	Nt
AFB ₁ / ZEA	8,5/ 1560	24	81,88±9,89 ^a	86,34±12,3 ^a	109,95±3,3 ^a	105,26±2,91 ^a
		48	69±9,47 ^a	52,77±1,98 ^b	72,91±7,26 ^b	70,24±6,94 ^b
		72	110,07±13,84 ^b	48,58±1,12 ^b	17,44±0,34 ^c	54,28±2,29 ^b
AFB ₁ / DON	8,5/ 1250	24	87,05±4,76 ^a	95,07±6,51 ^a	133,66±23,09 ^a	96,41±3,04 ^a
		48	89,41±2,54 ^a	93,69±7 ^a	71,45±7 ^b	92,33±4,32 ^{a,b}
		72	117,46±15,08 ^b	71,73±3,68 ^b	69,66±4,35 ^b	113,42±3,15 ^b

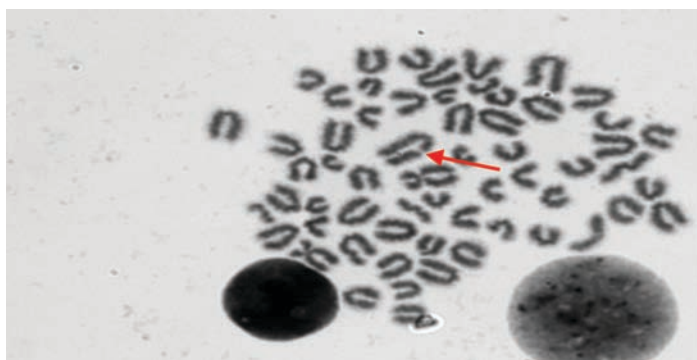
Ląstelių apoptozė, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, trijų pakartojimų reikšmės vidurkis ± standartinis nuokrypis. Skirtingos raidės ^{a,b,c} rodo statistiškai patikimą skirtumą (p<0,05) tarp atskirų ląstelių linijų veikiant jas mikotoksinais skirtingu laiku. Nt – netirta.

Apskaičiuojant optinio tankio vertes, naudojant KV dažą (3.6.3 lentelė), nustatytas stipriausias AFB₁ poveikis, sukėlęs didesnę nei 50 proc. ląstelių apoptozę BHL-21 ir MH-22A ląstelių linijoms po 72 val. (p<0,05). DON – inkstų (BHL-21) (p<0,05) ir PKEL (p<0,05) ląstelių linijoms po 72 val.

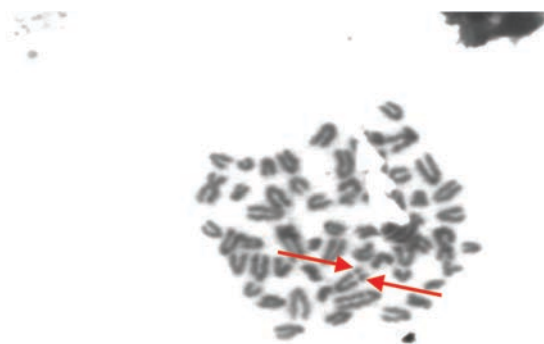
Palyginus atskirų kristalinių mikotoksinų ir jų mišinių poveikį, sukeliantį ląstelių apoptozę, nustatyta, kad stipriausiai apoptozę sukėlė po 72 val. AFB₁/DON/ZEA – PKEL (p<0,05) ląstelių linijoms, AFB₁/ZEA – BHL-21 (p<0,05) ir PKEL (p<0,05) ląstelių linijoms.

Lyginat mikotoksinų poveikį po 24 ir 72 val., sukeliantį ląstelių apoptozę, nustatyta, kad atskiri mikotoksinai ir jų mišiniai stipriausiai veikė visas ląstelių kultūras po 72 val.

Nustatytas genotoksinis kristalinių mikotoksinų AFB₁, ZEA, DON, ZEA/DON poveikis *in vitro* (3.6.4 lentelė) galvijų limfocitams, paveikus juos didžiausiomis pašaruose nustatytomis koncentracijomis. Ištyrus chromosominių aberacijų spektrą, didžiausias bendras ląstelių skaičius su pakitimais nustatytas paveikus limfocitų ląsteles ZEA (1560 µl/L) toksinu, o mažiausias – DON (1250 µl/L) toksinu. Didžiausią procentą visų pažeidimų, paveikus ląstelių limfocitus mikotoksinais, sudarė chromatidžių trūkiai bei spragos, kurių didelis kiekis parodo genomo nestabilumą. Didžiausias spragų procentas nustatytas paveikus limfocitų ląsteles DON toksinu, o chromosomų trūkiai – ZEA/DON (1560–1250 µl/L) mišiniu. Taip pat nustatytas chromosomų skaičiaus pakitimas (aneuploidija) dėl ZEA poveikio. Paveikus galvijų limfocitų ląsteles mikotoksinu AFB₁ (8,5 µl/L) ir įvertinus chromosomų aberacijų spektrą, rasti didžiausi dviejų tipų pakitimai – chromatodžių trūkiai ir spragos.



3.6.4 pav. Mikotoksino AFB₁ sukelta delecija (D₁) (iš autoriaus archyvo)



3.6.5 pav. Mikotoksino ZEA sukelta delecija (D₂ ir D₁) (iš autoriaus archyvo)

3.6.4 lentelė. Chromosomų aberacijos galvijų limfocitų ląstelėse, paveikus jas mikotoksinais AFB₁, ZEA, DON, ZEA/DON

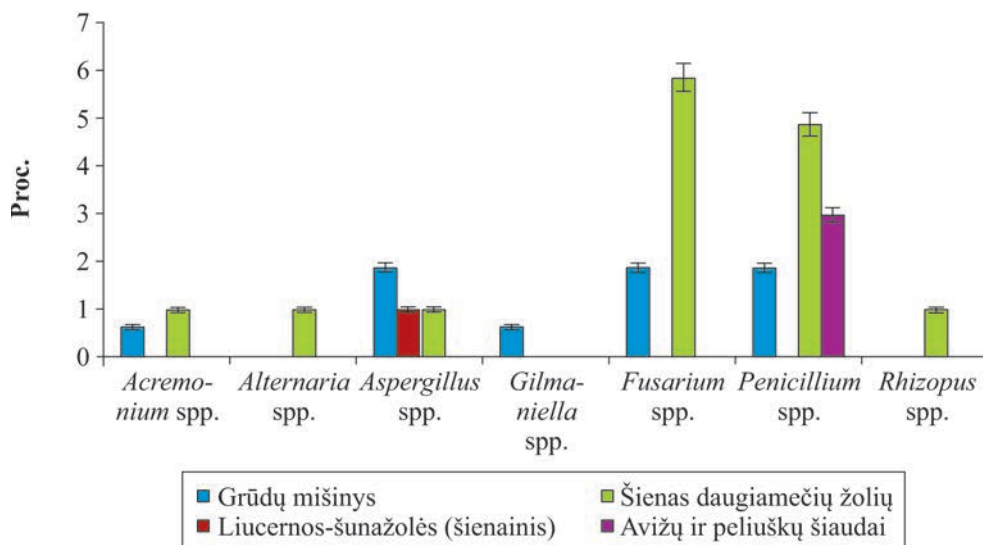
Miko- toksinai	Koncent- racija, µg/l	Ląstelių skaičius ^a	Chromatidžių trūkiai (delecija D ₁), proc.	Chromosomų trūkiai (delecija D ₂), proc.	Spragos (S), proc.	Fragmentai (F), proc.	Aneuploi- dija, proc.	Bendras ląste- lių skaičius su pakitimas, proc.	p
Kontrolė	0	150	1,33±1,33	0,67±1,33	1,33±1,33	0	–	3,08	0,004
AFB ₁	8,5	150	10,41±2,95	2,05±1,14	9,70±3,04	1,46±0,98	–	24,34	
Kontrolė	0	150	8±0	0,67±1,33	4,33±3,53	2,67±1,33	1,33±1,33	21,33	0,451
ZEA	1560	150	10,07±2	2,85±1,95	5,93±3,01	0	8,60±4,06	29,82	
Kontrolė	0	150	6,67±1,15	0,44±0,44	6,67±1,15	0	–	8,67	03
DON	1250	150	10±1,15	2,0±1,15	10±2,15	0	-	17,78	
Kontrolė	0	150	4,32±2,78	1,28±1,28	7,43±4,45	0	2,56±2,56	17,11	0,005
ZEA/ DON	1560/ 1250	150	10,04±2,24	3,13±1,64	8,28±0,89		1,48±1,48	23,4	

^a50 ląstelių kiekvienos karvės.

Chromosominių aberacijų dažniai skyrėsi tarp kontrolinių ir mikotoksinais paveiktų limfocitų ląstelių. Įvertinus aberacijų, nustatytų kontroliniuose mėginiuose, spektrą pastebėti pakitimai – chromatidžių trūkiai ir spragos, kurios yra tik pirminės DNR pažaidos.

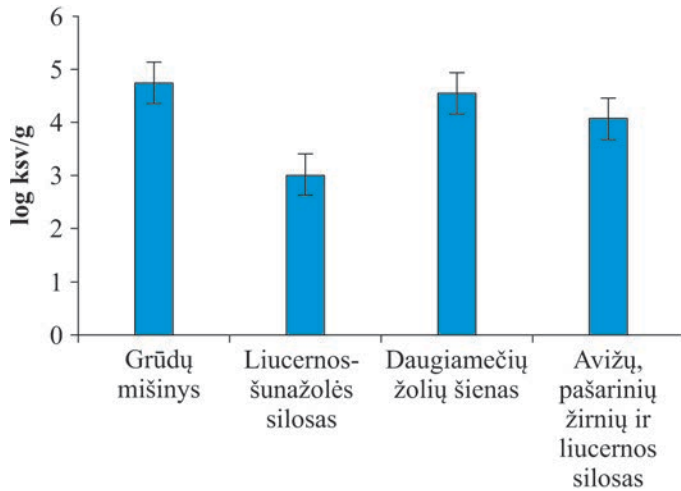
3.7. Natūraliai mikotoksinais užterštų pašarų poveikis melžiamoms karvėms ir detoksikuojančio preparato efektyvumo įvertinimas

Įvertinus iš X ūkio paimtų grūdinių ir silosuotų pašarų užkrėstumą mikroskopiniais grybais (3.7.1 pav.) nustatyta, kad grūdų mišinyje vyraavo *Aspergillus* spp. mikroskopiniai grybai, daugiamečių žolių šiene – *Fusarium* spp. ir *Penicillium* spp., avižų ir peliuškų šiauduose – *Penicillium* spp. (PUBLIKACIJA I).



3.7.1 pav. Mikroskopinių grybų aptikimo dažnis X ūkio pašaruose

Mažiausias gyvybingų sporų kiekis skaičius, t. y. 4 log ksv/g, nustatytas liucernos ir šunažolės silose, didžiausias – 4,73 log ksv/g grūdų mišinyje (3.7.2 pav.).



3.7.2 pav. Mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius pašaro mėginiuose

Pašarų mėginiuose ZEA didžiausias kiekis, t. y. 1000 $\mu\text{g/kg}$, nustatytas daugiamečių žolių silose, mažiausias šio toksino kiekis – 270 $\mu\text{g/kg}$, aptiktas grūdų mišinyje. DON didžiausias kiekis, t. y. 600 $\mu\text{g/kg}$, nustatytas taip pat daugiamečių žolių silose. Avižų, pašarinių žirnių, liucernos silose šio toksino aptikta mažiausiai – 350 $\mu\text{g/kg}$. AFB₁ daugiausiai aptikta grūdų mišinyje, t. y. 10 $\mu\text{g/kg}$, daugiamečių žolių šiene – 4 $\mu\text{g/kg}$.

Bandymų metu abiejuose karvių grupėse gyvulių gaišimų, traumų nepasitaikė, tačiau diagnozuota po vieną ūmų mastitą, kurie buvo atitinkamai gydomi. Laikyta, kad mastitai nedarė įtakos bandymo rezultatams. Bandymo metu karvių sveikatingumo rodikliai atitiko fiziologines normas abiejuose karvių grupėse (PUBLIKACIJA I, 2 lentelė).

Pieno kiekio ir sudėties tyrimai (PUBLIKACIJA I, 4 lentelė). Pieno primilžis padidėjo 12 proc. ($p > 0,05$) karvių grupėje (EG), kuri buvo šerta mikotoksinų absorbentu, ir 6,1 proc. ($p > 0,05$) kontrolinėje grupėje (KG), kuri mikotoksinų absorbentų negavo. Somatinių ląstelių kiekis 73,68 proc. ($p < 0,05$) padidėjo KG. Hematologiniai kraujo rodikliai (PUBLIKACIJA I, 5 lentelė) svyravo fiziologinių normų ribose. Biocheminiai kraujo rodikliai (PUBLIKACIJA I, 6 lentelė) svyravo fiziologinių normų ribose, išskyrus karbamidą, šis rodiklis KG padidėjo daugiau nei du kartus ($p > 0,05$). IgA sumažėjo 16,17 proc. ($p > 0,05$) KG ir padidėjo EG 14,45 proc. ($p < 0,05$).

3.8. Augalinių ekstraktų, kaip profilaktinių priemonių, panaudojimas gerinant siloso higieninę kokybę

Pasirinktų augalų, t. y. raudonėlio ir čiobrelės, vandeninių ir etanolinių ekstraktų prieš įterpiant juos į kukurūzų silosuojama žaliavą, nustatytas slopinamas poveikis, silosuotose pašaruose dažniausiai aptinkamiems mikroskopiniams grybams *A. fumigatus* ir *A. niger* (3.8.1 lentelė). Stipriausiu poveikiu pasižymėjo čiobrelės etanolinis ekstraktas prieš *A. fumigatus*, tačiau jis visai neslopino *A. niger* augimo. Čiobrelės vandeninis ekstraktas *A. fumigatus* augimą sumažino 34 proc., tačiau *A. niger* augimo neslopino. Raudonėlio vandeninis ekstraktas neslopino nei vienos pasirinktos mikroskopinių grybų rūšies. Tačiau etanolinis raudonėlio ekstraktas slopino ir *A. fumigatus* augimą – 88,0 proc., o *A. niger* – 60,0 proc.

3.8.1 lentelė. Augalinių ekstraktų slopinantis poveikis *A. fumigatus* ir *A. niger*

Mikroskopiniai grybai	C EE 50 (proc.)	C VE 50 (proc.)	R EE 50 (proc.)	R VE 50 (proc.)
<i>A. fumigatus</i>	100	34	88,04	0
<i>A. niger</i>	0	0	60	0

C-EE-50 – čiobrelės etanolinis ekstraktas (50 g čiobrelės ir 200,0 ml 70,0 proc. maistinis etilo alkoholis); C-VE-50 – čiobrelės vandeninis ekstraktas (50 g čiobrelės ir 200,0 ml distiliuoto vandens); R-EE-50 – raudonėlio etanolinis ekstraktas (50 g raudonėlio ir 200,0 ml 70,0 proc. maistinis etilo alkoholis); R-VE-50 – raudonėlio vandeninis ekstraktas (50 g raudonėlio ir 200,0 ml distiliuoto vandens).

Kukurūzų žaliavos prieš fermentaciją cheminiai ir mikrobiologiniai rodikliai yra pateikti 3.8.2 lentelėje. Kukurūzų siloso, silosuoto laboratorinėmis sąlygomis, cheminiai fermentaciniai ir higieniniai rodikliai pateikti atitinkamai 3.8.3 ir 3.8.4 lentelėse.

3.8.2 lentelė. Kukurūzų žaliavos prieš fermentaciją cheminė, higieninė kokybė, mikotoksinių koncentracijos

Sausosios medžiagos (SM), g/kg	pH	Mikroorganizmų skaičius, log ksv/g				Mikotoksinių koncentracija, µg/kg			
		Mikroskopinių grybų	Mielių	Bendras bakterijų skaičius	Pienarūgščių bakterijų skaičius	AFB ₁	ZEA	DON	T-2
395,0±70,9	4,99±0,23	4,89±0,11	3,39±0,09	4,55±0,12	5,42±0,06	N	600	100	250

N – žemiau aptikimo ribos t. y. <1.

3.8.3 lentelė. Kukurūzų siloso 90 d. po sudėjimo cheminiai fermentaciniai rodikliai

Parametrai	R-VE ^a 50	R-VE ^b 25	R-EE ^c 50	R-EE ^d 25	C-VE ^e 50	C-VE ^f 25	C-EE ^g 50	C-EE ^h 25	KV ⁱ	KS ^j	KC ^k	KG ^l	K ^m	p
Karvakrolis± SSN, proc.	<A.R.	<A.R.	6,4± 3,7	5,3± 2,9	4,1± 3,2	<A.R.	93,7± 3	94,5± 0,3	–	–	–	–	–	–
Timolis± SSN, proc.	<A.R.	<A.R.	12,3± 3,7	8,5± 0,7	29,6± 0,9	<N.R.	628,5± 1,3	819± 0,8						
Sausosios medžiagos, g/kg	303,7± 7,6 ^{b,m}	375,5± 50,4 ^a	334,5± 26,5	344,4± 5,5	347,65± 3,75	346,50± 27,29	316,45± 5,35 ^m	350,75± 3,23	353,35± 20,58	331,85± 9,55	341,05± 9,65	311,7± 11,7 ^m	389,05± 38,65 ^{a,g,l}	0,331
pH	3,93± 0,05	3,89± 0,03	3,96± 0,03	3,93± 0,06	3,87± 0,06	4,04± 0,14	3,97± 0,01	3,94± 0,04	3,99± 0,14	3,82± 0,04	3,85± 0,06	4,03± 0,19	3,99± 0,07	0,784
Amoniakinis azotas (proc. bendr. N)	2,5±0,5	5,5±0,5 ^c	1,5± 0,71 ^b	3,5±0,5	2,5±1,5	2±1 ^b	2±1 ^b	1,5±1,5 ^b	3,5±0,5	2±0,01 ^b	1±1 ^{b,m}	1,5±0,5 ^b	4,5±2,5 ^k	0,244
Fermentinių rugščių suma (TFA), g/kg SM	28,5± 1,5 ^g	31±1 ^g	22± 0,01 ^{d,i}	32± 6 ^{c,g}	27,5± 1,5	23,5± 3,5	18,5± 0,5 ^{a,b,d,i,l}	23±8	25±1	32,5± 0,5 ^{c,g}	27,5± 3,5	28,5± 0,5 ^g	26,5±2,5	0,205
Pieno rūgštis (proc. TFA)	36,4± 5,9	23,4± 2,8	38,2± 8,8 ^g	43,65± 3,85 ^g	34±2,2	41,75± 4,85 ^g	24,65± 0,15 ^{c,d,f,i,j,k}	24,25± 20,75	38,05± 0,65 ^g	45,55± 8,25 ^g	41,75± 1,55 ^g	32,4± 6,3	36,05± 1,55	0,244
Acto rūgštis (g/kg SM)	13,5± 0,5	16,3± 4,3	10,5± 1,5	11,5± 4,5	13±1	10,5± 2,5	12±0,01	12,5± 1,5	11±1	14±2	12,5± 0,5	12,5± 0,5	12,5±2,5	0,873

3.8.4 lentelė. Kukurūzų siloso 90 d. po sudėjimo higieninė kokybė, mikotoksinų koncentracijos

Parametrai	R-VE ^a 50	R-VE ^b 25	R-EE ^c 50	R-EE ^d 25	C-VE ^e 50	C-VE ^f 25	C-EE ^g 50	C-EE ^h 25	KV ⁱ	KS ^j	KC ^k	KG ^l	K ^m	p
Karvakrolis± SSN, proc.	<A.R.	<A.R.	6,4± 3,7	5,3± 2,9	4,1± 3,2	<A.R. <N.R.	93,7± 3	94,5± 0,3	–	–	–	–	–	–
Timolis± SSN, proc.	<A.R.	<A.R.	12,3± 3,7	8,5± 0,7	29,6± 0,9		628,5± 1,3	819± 0,8						
Pienarūgščių bakterijų skai- čius, log ksv/g	4,2± 0,04	4,21± 0,02	4,14± 0,04 ^j	4,11± 0,1 ^{ij}	4,14± 0,12 ^j	4,13± 0,1 ^j	4,22± 0,03	4,2± 0,09	4,14± 0,05	4,16± 0,28 ^{c,d,e,f,k,l}	4,17± 0,0 ^{lj}	4,15± 0,02 ^j	4,12±0,22	0,469
Mikroskopinių grybų skaičius, log ksv/g	3,61± 0,21	3,8± 0,2	3,94± 0,06	4± 0,01	3,63± 0,15	3,54± 0,24 ^m	3,94± 0,04	3,74± 0,26	3,51± 0,5 ^{lj,m}	4,17± 0,04	3,52± 0,22 ^{j,m,l}	3,96± 0,06 ^{i,k}	4,25± 0,18 ^{f,i,k}	0,282
Mielių skai- čius, log ksv/g	4,25± 0,12	3,89± 0,11	3,47± 0,07	4,19± 0,13	1,94± 0,09	2,03± 0,03	4,13± 0,22	4,09± 0,22	4,44± 0,27	4,01± 0,53	3,27± 0,19	2,22± 0,14	2,06±0,2	0,723
Bendras bakte- rijų skaičius, log ksv/g	4,55± 0,06 ^{ij,m}	4,64± 0,14 ^{ij,m}	4,4± 0,09 ^{ij,m}	4,78± 0,18	4,78± 0,01	4,45± 0,45 ^{ij,m}	4,74± 0,04	4,62± 0,02 ^{ij,m}	5,2± 0,2 ^{a,b,c,f,h,l}	5,27± 0,09 ^{a,b,c,f,h,l}	4,75± 0,16	4,45± 0,15 ^{ij,m}	5,24± 0,16 ^{a,b,c,f,h,l}	0,030
AFB ₁ (μg/kg)	2,5± 0,25	2,2±0,9	5± 2 ^{f,g,l,m}	4±1,4	2±0,01	1± 0,01 ^{c,k}	0,7± 0,07 ^{c,k}	1,7±1	1,5±0,5	1,5±0,5	5± 2 ^{f,g,l,m}	0,9± 0,2 ^{c,k}	0,5±0,5 ^{c,k}	0,197
ZEA (μg/kg)	235± 35	535± 135	165± 35 ^{j,k}	385± 85	435± 235	485± 185	380± 80	335± 165	510± 160	585± 85 ^c	565± 35 ^c	475± 175	435±35	0,547

3.8.4 lentelės tęsinys

Parametrai	R-VE ^a 50	R-VE ^b 25	R-EE ^c 50	R-EE ^d 25	C-VE ^e 50	C-VE ^f 25	C-EE ^g 50	C-EE ^h 25	KV ⁱ	KS ^j	KC ^k	KG ^l	K ^m	p
DON _(μg/kg)	325±80	138±10	240±90	34±10	375±130 ^h	200±100	250±1	400±50 ^{e,i,m}	375±125 ^h	275±175	150±150	200±100	425±75 ^h	0,358
T-2/HT _(μg/kg)	25±25 ^m	0 ^m	100±50	75±11	0 ^m	100±14	50±50 ^m	50±17 ^m	25±2,5 ^m	63±63	150±100	38±12 ^m	230±30 ^{a,b,e,g,h,i,l}	0,307

Skirtingos raidės ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m} rodo statistiškai patikimą skirtumą ($p < 0,05$) tarp atskirų mėginių esančių toje pačioje eilutėje.

R-VE-50 – 20 ml raudonėlio vandeninis ekstraktas (50 g raudonėlio ir 200 ml distiliuoto vandens); R-VE-25 – 20 ml raudonėlio vandeninis ekstraktas (25 g raudonėlio ir 200 ml distiliuoto vandens); R-EE-50 – 20 ml raudonėlio etanolinis ekstraktas (50 g raudonėlio ir 200 ml 70,0 proc. maistinis etilo alkoholis); R-EE-25 – 20 ml raudonėlio etanolinis ekstraktas (25 g raudonėlio ir 200 ml 70 proc. maistinis etilo alkoholis); C-VE-50 – 20 ml čiobrelbio vandeninis ekstraktas (50 g čiobrelbio ir 200 ml distiliuoto vandens); C-VE-25 – 20 ml čiobrelbio vandeninis ekstraktas (25 g čiobrelbio ir 200 ml distiliuoto vandens); C-EE-50 – 20 ml čiobrelbio etanolinis ekstraktas (50 g čiobrelbio ir 200 ml 70 proc. maistinis etilo alkoholis); C-EE-25 – 20,0 ml čiobrelbio etanolinis ekstraktas (25 g čiobrelbio ir 200 ml 70 proc. maistinis etilo alkoholis); KV – 20 ml kontrolė su distiliuotu vandeniu; KS – 20 ml kontrolė su etilo alkoholiu (70 proc. maistinis etilo alkoholis); KC – kontrolė su siloso inokuliantu (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, ksilanazė); KG – kontrolė su siloso inokuliantu (*L. plantarum*, *E. faecium*, *P. acidilactici*); K – kontrolė, nieko neįterpant; <A.R. – aptikimo riba; <N.R. – nustatymo riba; p – patikimumas tarp tirtų mėginių tų pačių rodiklių vienoje eilutėje.

Didžiausias karvakrolio ir timolio kiekis nustatytas čiobrelės etanoliniuose ekstraktuose. Raudonėlio, abiejuose skirtingų koncentracijų, ir čiobrelės, mažesnės koncentracijos, vandeniniuose ekstraktuose šių fenolinių junginių neaptikta.

Cheminiai fermentaciniai rodikliai (3.8.3 lentelė). Siloso pH, visų tirtų mėginių, variavo nuo 3,92 iki 4,04. Didžiausias sausų medžiagų kiekis nustatytas kontroliniame mėginyje (389,05 g/kg) ir R-VE-25 (375,5 g/kg). Mažiausias sausų medžiagų kiekis nustatytas R-VE-50 (303,7 g/kg). Didžiausias amoniakinio azoto kiekis ($\text{NH}_3\text{-N}$) nustatytas kontroliniame mėginyje be jokių priedų – 4,5 proc. bendr. N ir mėginyje R-VE-50 – 5,5 proc. bendr. N. Raudonėlio vandeniniuose ekstraktuose, t. y. R-VE-50 ir R-VE-25, didžiausias acto rūgšties kiekis ir R-VE-25 nustatytas mažiausias pieno rūgšties kiekis, lyginant su visais mėginiais.

Įterpiant ekstraktus į siloso žaliavą, sumažėjo sausų medžiagų kiekis siloso mėginiuose, lyginat su kontrole (K).

Įvertinus tirtų mėginių *higieninę kokybę* (3.8.4 lentelė), kontroliniame mėginyje (K) nustatytas didžiausias bendras bakterijų ir mikroskopinių grybų skaičius bei mikotoksinų DON ir T-2 didžiausios koncentracijos.

Mažiausias mikroskopinių grybų skaičius nustatytas mėginiuose su biologiniu inokuliantu (KC), t. y. 17,7 proc. ($p < 0,05$) mažiau nei kontroliniuose mėginiuose (K), kuriuose nustatytas didžiausias mikroskopinių grybų skaičius bei bendras bakterijų skaičius. Pienarūgščių bakterijų ir mielių skaičius tarp mėginių nebuvo patikimas.

*Mikotoksina*i. Mažiausios AFB₁ koncentracijos, t. y. mažiau nei $< 1 \mu\text{g/kg}$, nustatyta kontroliniame mėginyje (K), mėginyje su biologiniu inokuliantu (KG) ir mėginyje su etanoliniu čiobrelės ekstraktu.

Didžiausios ZEA koncentracijos, t. y. didesnės nei $500 \mu\text{g/kg}$, nustatytos kontroliniuose mėginiuose su etanolium (KS) ir vandeniu (KV), mėginiuose su raudonėlio vandeniniu ekstraktu (R-VE-25) ir su siloso inokuliantais (KC). DON didžiausios koncentracijos, t. y. didesnės nei $400 \mu\text{g/kg}$, nustatytos kontroliniame (K) ir su čiobrelės etanoliniu ekstraktu (C-EE-25) mėginiuose. Didžiausia T-2 toksinų koncentracija nustatyta kontroliniame mėginyje (K).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Žaliavų ir iš jų gaminamų silosuotų pašarų, paimtų skirtingais laikotarpiais po sudėjimo iš skirtingas ūkininkavimo sistemas taikančių ūkių, higieninė kokybė

Geros kokybės silosuoti pašarai gali būti pagaminti tik iš tinkamos kokybės žaliavos, nes nuo jos priklauso bendra pašaro kokybė, gyvūnų sveikatingumas, gyvūninės kilmės produkcija. Siloso konservavimas – vienas iš pašarų konservavimo metodų, paremtas vandenyje tirpių angliavandenių skaidymu iki organinių rūgščių, kuriame svarbų vaidmenį atlieka pienarūgštės bakterijos. Jos yra priskiriamos pageidaujamai silosuotų pašarų mikroflorai, lemiančios pašarų higieninę kokybę. Tačiau silosuotose pašaruose neretai aptinkami ir nepageidaujami mikroorganizmai, tokie kaip mikroskopiniai grybai, mielės, klostridijos, listeria, kurie blogina pašaro kokybę, ypač atidarius siloso tranėšėjas šėrimui. Vis daugiau ūkių taiko uždara gyvulių laikymo sistemą, kai gyvuliai laikomi fermose ir šeriami silosuotais pašarais visus metus. Todėl ypač svarbi šių pašarų higieninė kokybė, tai yra juose vyraujanti mikroflora, jos sintezuojami metabolitai. Žinoma, kad mėsos, pieno savybės, sudėtis, t.y. kokybė, produkcijos kiekis taip pat priklauso nuo pašaro kokybės. Todėl svarbu, kad gyvuliai būtų šeriami gerai subalansuotais, biologiškai vertingais, neužterštais cheminėmis medžiagomis, geros higieninės kokybės pašarais. Ypač aktuali pašaro higieninė kokybė, nes pašarai, jų žaliavos – gera terpė augti ir daugintis įvairiems mikroorganizmams.

4.1.1. Kukurūzų žaliavos ir iš jos gaminamų silosuotų pašarų higieninė kokybė

Silosavimas yra vienas iš žolinių pašarų konservavimo būdų. Jis pagrįstas augaluose esančių vandenyje tirpių angliavandenių fermentacija į organines rūgštis. Šiame procese dalyvauja pieno rūgšties bakterijos, kurios gamina organines rūgštis ir mažina siloso pH. Mūsų atliktų tyrimų metu pienarūgščių bakterijų skaičius tirtuose kukurūzų siloso mėginiuose statistškai patikimai didėjo nuo žaliavos iki 8 mėnesių po sudėjimo.

Mikroskopiniai grybai ir jų antriniai metabolitai silosuotose pašaruose bei jų žaliavoje gali būti viena iš daugelio priežasčių, darančių neigiamą poveikį gyvulių sveikatingumui bei mažinančių pašarų kokybę, mitybinę vertę. Storm ir bendraautorių duomenimis, didžiausias nepageidaujamų mikroorganizmų kiekis kukurūzų silose nustatytas 5–7 mėnesiai nuo siloso sudėjimo ir mažiausias po 11 mėnesių [153]. Mikroskopinių grybų skaičius

pašaruose ir jų žaliavoje yra vienas iš pašaro kokybę lemiančių rodiklių. Geros gamybos praktikos (GGP) duomenimis, rekomenduojamas mikroskopinių grybų skaičius pašaruose – $1 \cdot 10^4$ ksv/g (4 log ksv/g) [70]. Mūsų tirtuose mėginiuose, t. y. kukurūzų žaliavoje ir 3 mėnesių po sudėjimo silose, nustatytas didesnis mikroskopinių grybų skaičius nei rekomenduojama GGP. Didesnis nei rekomenduojamas šių mikroorganizmų kiekis pašaruose gali sukelti kvėpavimo takų pažeidimus, sutrikdyti prieskrandžių veiklą, reprodukcinę sistemą, sukelti akių ir odos dirginimą [4, 6]. Taip pat mūsų atliktų tyrimų metu nuo žaliavos iki 8 mėn. po siloso sudėjimo statistiškai patikimai padidėjo mielių skaičius, kas rodo prasidėjusį aerobinį gedimą. Mielės aerobinių sąlygų metu skaido pieno rūgštį į anglies dvideginį ir vandenį, padidėja substrato pH, pradeda vystytis kiti nepageidaujami mikroorganizmai [118].

Mūsų tyrimų metu, ištyrus silosuotų mėginių užterštumą nepageidaujamais mikroorganizmais, tokiais kaip *Listeria* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp., aptikta 12,5 proc. tirtų mėginių, iš jų 13,3 proc. kukurūzų silose ir 6,7 proc. silosuotame pašare ritiniuose. Iš jų 80 proc. identifiukuota *L. monocytogenes*. Vienu mokslinių tyrimų duomenimis – šiais mikroorganizmais silosas užterštas būna žiemos periodu, tačiau yra duomenų, kai didesnis užterštumas nustatytas vasaros laikotarpiu. Mūsų tirtuose kukurūzų siloso mėginiuose didžiausias užterštumas *L. monocytogenes* nustatytas prieš fermentacijos procesą, t. y. žaliavoje, po fermentacijos šių nepageidaujamų mikroorganizmų sumažėjo daugiau nei du kartus. Vilar su bendraautoriais aptiko *Listeria* spp. 33,7 proc. siloso mėginių, surinktų iš šiaurės vakarų Ispanijos. Tyrimų metu atlikta statistinė analizė parodė patikimą koreliacinį ryšį tarp aukšto siloso pH ($\text{pH} > 4,5$) ir *Listeria* spp. aptikimo dažnio. Mokslininkų Borucki su bendraautoriais nustatyta statistiškai patikima koreliacija ($p < 0,05$) tarp pH ir *L. monocytogenes*, kai pH teigiamuose mėginiuose – 04,62, o mėginiuose, kuriuose neaptikta šių patogeninių mikroorganizmų – 4,4 [117].

Lietuvoje būdingas vėsus, lietingas ir drėgnas klimatas, daugiausia kritulių iškrenta vasarą, mažiau rudenį, lietingas ir drėgnas oras siloso ruošimo, sandėliavimo periodais taip pat gali lemti *L. monocytogenes* paplitimą silose. Mūsų tyrimų metu kukurūzų žaliavoje prieš fermentaciją 25 proc. mėginių nustatyta *L. monocytogenes*. Šie nepageidaujami mikroorganizmai į pašarinę žaliavą galėjo patekti per užterštą dirvožemį nuimant derlių. Nightingale ir kitų mokslininkų tyrimais nustatytas šių bakterijų kiekis buvo didesnis dirvožemyje nei pašaruose, tad galima teigti, kad dirvožemis yra vienas iš *Listeria* spp. taršos šaltinių. Mokslinių tyrimų duomenimis, siloso užterštumas *Listeria* spp. dažniausiai susijęs su prastos kokybės silosu, kai $\text{pH} < 5,5$, tačiau jau esant $\text{pH} < 4,8$ – tinkama ir palanki terpė šių bakterijų

vystymuisi. Mūsų tirtuose fermentuotose mėginiuose, kuriuose aptikta *L. monocytogenes*, pH variavo nuo 3,48 iki 5,19 [114].

Sviesto rūgštį ir dujas produkuojančios klostridijos dar yra vadinamos sviesto rūgšties bakterijomis. Jos dažniausiai aptinkamos prastos fermentacijos kukurūzų silose, viršutiniuose apipelijusiuose sluoksniuose. 2007 metais Olandijoje atliktuose tyrimuose šių mikroorganizmų aptikta daugiau kukurūzų nei žolės silose. Šiame tyrime siloso mėginiai buvo surinkti iš 21 pienuose karvių ūkių. Tyrimų metu žolės silose nustatyta klostridija sporų 5 log ksv/g, didelės koncentracijos klostridijų sporų (69 proc. mėginių) aptikta kukurūzų silose, paėmus mėginius iš supelijusių vietų. Nustatytas sviesto rūgšties bakterijų kiekis susietas su aerobiniu gedimu, t. y. 13 proc. mėginių nustačius mikroskopinių grybų ir mielių daugiau nei 5 log ksv/g, klostridijų aptikta 5 log ksv/g, taip pat šis klostridijų kiekis aptiktas siloso mėginiuose, kurių pH daugiau nei 4,4 [172].

Mūsų atliktų tyrimų metu 2 proc. *C. perfringens* aptikta kukurūzų žaliavoje, kurios pH variavo nuo 4,55 iki 6,04 ir 2 proc. mėginiuose, paimtuose 8 mėn. po sudėjimo, kurių pH 4,3. Tai galima paaiškinti tuo, kad atidarius tranšęją šėrimui, susidaro aerobinės ir anaerobinės nišos, ir minėtos bakterijos pasisavina reikalingas rūgštis, susidariusias oksidacijos metu dėl anaerobinių bakterijų veiklos. Jeigu silosas iš tranšęjos nebus paimamas ir šeriamas kas dieną, per 15 dienų nuo tranšęjos atidarymo susidarys tinkama aerobinė/anaerobinė terpė klostridijų augimui [23, 24]. Esant mažam sausų medžiagų kiekiui, *C. tyrobutyricum* sporos, aptiktos žolės silose po 14 dienų tranšęjos atidarymo šėrimui [119].

Supelijusius pašarus lengva atpažinti ir organoleptiškai įvertinti dėl didelių filamentinių struktūrų bei spalvotų sporų. Mikroskopiniai grybai greitai pradeda vystytis ir daugintis ten, kur patenka deguonis. Dėl didelės mikroskopinių grybų populiacijos, jų plataus paplitimo ir dažno aptikimo silosuotuose pašaruose būtina stebėti šios mikrofloros paplitimą. Skirtingi autoriai savo atliktuose tyrimuose nustatė, kad apie 89,00 proc. tirtų siloso mėginių yra užteršta įvairiais mikroskopiniais grybais (labai skirtingomis koncentracijomis). Dažniausiai nustatytos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. ir *Fusarium* spp. kukurūzų ir žolės silose. Mūsų atliktuose tyrimuose taip pat daugiausiai aptikta šių genčių. Didžiausias *Fusarium* spp. kiekis aptiktas žaliavoje, o kitos gentys kukurūzų silose. Labai nedidelis kiekis *Fusarium* spp. nustatytas siloso mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo, ir visai neaptikta mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po sudėjimo. Labai prieštaringi duomenys gauti kitų mokslinių tyrimų metu, kuriuose *Fusarium* spp. buvo aptikta silosuotuose kukurūzų pašaruose, nors ši gentis yra jautri mažam deguonies kiekiui bei žemam pH [60, 62]. *A. fumigatus* ir *A. flavus* dažniausiai aptinkamos rūšys kukurūzų silose [121]. Mūsų tyrimų metu didžiausias

A. fumigatus kiekis nustatytas 8 mėn. po sudėjimo. *Mucor* spp., *Absidia* spp., *Geotrichum* spp., *Scopulariopsis* spp., *Trichoderma* spp. taip pat dažnai aptinkamos mikroskopinių grybų gentys silosuotose pašaruose, kurios nustatytos ir mūsų tyrimų metu.

Aerobinis siloso gedimas atidarius tranšėjas siejamas ne tik su sausųjų medžiagų nuostoliu, bet ir su padidėjusia mikotoksinų rizika pašaruose. ZEA ir DON yra visame pasaulyje dažniausiai aptinkami mikotoksinai kukurūzų silose, kai kitų toksinų aptikimo dažnis ir jų koncentracija priklauso nuo vietinio regiono klimatinio sąlygų [38, 67, 76,]. Iš esmės visi toksinai, nustatyti siloso žaliavoje, taip pat gali būti aptikti ir silosuotame pašare. Tačiau, ilgėjant sandėliavimo laikotarpiui, mikotoksinų kiekis mažėja dėl rūgštinės, anaerobinės aplinkos, dėl kurios metabolizuojasi kai kurie mikotoksinai, susidarę prieš fermentaciją [62]. Skladanka ir jo bendraautorai pateikė prieštaraujančią versiją, teikdami, kad mikotoksinai nesuyra fermentacijos proceso metu [146]. Mūsų tyrimų metu kukurūzų silose ir jo žaliavoje, visuose mėginiuose, nustatyti ZEA ir DON mikotoksinai, produkuojami *Fusarium* spp. Iš mūsų gautų tyrimų rezultatų matome, kad kukurūzų žaliava ir silosas yra užteršti šiais mikotoksinais, nors *Fusarium* spp. aptikta tik žaliavoje ir nedidelis kiekis silose po 8 mėnesių po sudėjimo. Visos kukurūzų žaliavoje ir silose nustatytos DON koncentracijos neviršijo 8000 µg/kg, t. y. Komisijos Rekomendacijos (ES) 2016/1319 nustatyto rekomendacinio limitu grūdams ir jų produktams, įskaitant produktus iš kukurūzų. ZEA koncentracija pagal Komisijos Rekomendacijos (ES) 2016/1319 grūdams ir jų produktams, įskaitant produktus iš kukurūzų – 2000,00 µg/kg. Mūsų tirtuose mėginiuose ši koncentracija nebuvo viršyta. Nebuvo viršyta ir OTA koncentracija pagal Komisijos Rekomendacijos (ES) 2016/1319 grūdams ir jų produktams, įskaitant produktus iš kukurūzų – 250 µg/kg. Laboratorinėmis ir gamybinėmis sąlygomis atlikus tyrimus, Cavallarin su bendraautorais nustatė, kad aflatoksinas kukurūzų silose susidaro dėl aerobinio siloso gedimo. Šie autoriai nustatė, kad aflatoksinas kukurūzų silose susidarė po 15 dienų atidarius tranšėją šėrimui dėl oro poveikio [34]. Pagal mūsų gautus tyrimų rezultatus AF (bendrai) didžiausia koncentracija nustatyta silose, paimtame 3 mėn. po sudėjimo, o silose, paimtame 8 mėn. po sudėjimo AF (bendrai) sumažėjo 3 proc.

Mažai yra duomenų apie biogeninių aminų susidarymą ir aptikimą silosuotose pašaruose. Šie junginiai silosuotose pašaruose mažina pašaro skonines savybes bei gali sutrikdyti gyvulio sveikatingumą, nes į atrajotojų organizmą aminai patenka per pašarą bei sintezuojami prieskrandžių mikrofloros. Tačiau Van Os atliktuose tyrimuose nepastebėta biogeninių aminų neigiamo poveikio pieninėms karvėms, kai su pašaru gavo tiramino, putrescino, kadaverino ir histamino, atitinkamai 1,0; 0,7; 0,6; ir 0,5 g/kg.

Mūsų atliktų tyrimų metu nustatytos didžiausios kadaverino koncentracijos 898,22 mg/kg silose, paimtame 3 mėn. po sudėjimo ir 633,57 mg/kg silose, paimtame 8 mėn. po sudėjimo [169]. Mokslininkų Steidlová su bendraautoriais atliktuose tyrimuose nustatyti biogeniniai aminai 5 litrų kukurūzų silose (grūdainyje): 147 mg/kg tiramino, 136 mg/kg putrescino, 96,2 mg/kg kadaverino, 37,9 mg/kg spermidino, 3 mg/kg histamino, 2,8 mg/kg spermino ir 2,5 mg/kg triptamino. Pastebėtas šių nepageidaujamų junginių kitimas skirtingais metais [152].

4.1.2. Ekologiniuose ir įprastinės gamybos ūkiuose į ritinius susuktų silosuotų pašarų higieninė kokybė

Pagal Europos Sąjungos direktyvas, taikomas ekologiniams ūkiams, draudžiami ir ribojami cheminiai konservantai, įvairūs priedai, gerinantys fermentacijos procesą ir mažinantys patogeninių bakterijų dauginimąsi. Mūsų atliktų tyrimų duomenimis, mikroskopinių grybų skaičius nustatytas 8 proc didesnis žaliavoje, skirtoje silosuoti į ritinius iš ekologinių ūkių, tačiau silose, paimtame po 8 mėn. po susukimo, jis sumažėjo ir buvo toks pats kaip ir įprastinės gamybos ūkiuose. Mielių didesnis kiekis aptiktas žaliavoje iš įprastinės gamybos ūkių, jis išliko didesnis ir siloso mėginiuose. Didžiausias pienarūgščių bakterijų kiekis nustatytas siloso mėginiuose iš ekologinių ūkių.

Literatūros duomenimis, *Listeria* spp. ir *L. monocytogenes* pašaruose dažniau aptinkama ir identifikuojama žiemą ir rudenį nei vasaros sezonu. Ši nepageidaujama mikroflora dažniau aptinkama pašaruose, pagamintuose ekologiniuose ūkiuose. Mūsų tyrimų duomenys nesutapo su duomenimis Latvijos mokslininkų Konosonoka ir jo bendraautorių, kurie identifikavo *Listeria* spp. ir *L. monocytogenes*, atitinkamai 14,8 proc. ir 29 proc. pašaruose iš ekologinių ūkių ir 5,2 proc. ir 29,6 proc. iš įprastinės gamybos ūkių [89].

Į ritinius silosuotose pašaruose mūsų tyrimų metu *L. monocytogenes* aptikta 20 proc. mėginių, didesnis mėginių skaičius užterštas šiais nepageidaujamais mikroorganizmais – iš įprastinės gamybos ūkių. Fulgueira su bendraautoriais teigimu pašarų silosavimas į ritinius dėl prasto suslėgimo silsосуojant, mažos drėgmės gali sudaryti palankias sąlygas *Listeria* spp. dauginimuisi ir vystymuisi pašaruose [63].

Nors klostridijos yra griežti anaerobai, tačiau yra atlikta tyrimų, kurių metu aptiktos šių nepageidaujamų mikroorganizmų sporos siloso aerobinio gedimo metu [118]. Mūsų atliktų tyrimų metu *Clostridium* spp. aptikta didesniame mėginių skaičiuje iš ekologinių ūkių, o *C. perfringens* – iš abiejų ūkių siloso mėginiuose, paimtuose po 8 mėn. po susukimo į ritinius.

Borreani su bendrautoriais atliktuose tyrimuose, stebint mikroorganizmų kitimą tarp jų ir *Clostridia* spp., priklausomai nuo sandėliavimo laiko po susukimo, nustatytas didesnis mikroorganizmų ir *Clostridia* spp. kiekis mėginiuose, paimtuose 4 mėn. po susukimo, lyginant su mėginiais, paimtais 2 mėn. po susukimo. Autoriai šį pokytį susiejo su ritiniams gaminti naudota plėvele, kuri galėjo praleisti deguonį į ritinius [24].

Yra atlikta nedaug tyrimų apie mikroskopinių grybų paplitimą silosuotose pašaruose, susuktuose į ritinius, ypač iš ekologinių ūkių. O'Brien su bendrautoriais atliktuose tyrimuose, kuriuose buvo ištirta daugiamečių žolių silosuotų į ritinius užterštumas mikroskopiniais grybais bei mielėmis, mėginiai buvo surinkti iš skirtingų Airijos ūkių [117]. Nustatyta, kad 92 proc. siloso mėginių, susuktų į ritinius, užteršta šiais mikroorganizmais. Dominavusios rūšys buvo *P. roqueforti*, *Chizophyllum commune*, *Pichia fermentans*, *Penicillium paneum* ir *Mucor* genties grybai. Mūsų tyrimų duomenimis, žaliavoje iš ekologinių ūkių nustatytas didesnis *Fusarium* spp., bei *Aspergillus* spp., lyginant su mėginiais iš įprastinės gamybos ūkių. *Fusarium* spp. paplitimas pašaruose ar maisto produktuose, antrinių metabolitų produkavimas gali priklausyti ir nuo pasirinktų skirtingų ūkininkavimo būdų. Mažesnės mikotoksinų T-2 ir HT-2 koncentracijos nustatytos grūduose ir jų produktuose iš ekologinių ūkių. Taip pat buvo nustatytas mažesnis grūdų pažeidimas *Fusarium* spp. ekologiškai augintuose javuose [18]. Mūsų tyrimu metu skirtingos toksinų koncentracijos nustatytos siloso mėginiuose iš abiejų ūkininkavimo sistemų, tačiau vidutinės jų koncentracijos neviršijo Komisijos Rekomenduojamų normų. Yra labai mažai atlikta mokslinių darbų apie mikotoksinų paplitimą pašaruose iš ekologinių ūkių, ypač silosuotose pašaruose. Mūsų atliktų tyrimų metu, didesnės mikotoksinų AF (bendrai), ZEA, T-2/HT-2 koncentracijos nustatytos mėginiuose iš ekologinių ūkių, o DON – iš įprastinės gamybos ūkių. Baliukonienės su bendrautoriais atliktuose tyrimuose nustatyta mikotoksinų koncentracija į ritinius silosuotų pašarų Lietuvoje, neskirstant pagal ūkininkavimo sistemas. Šių tyrimų metu nustatyta: AF (bendrai) – $21,2 \pm 3,9$ µg/kg, DON – $471 \pm 65,6$ µg/kg, ZEA – $397,5 \pm 83,5$ µg/kg [15]. Jungtinėje Karalystėje nustatytos mikotoksinų koncentracijos žolės silose $11,9$ µg/kg – T-2 ir $61,8$ µg/kg – ZEA. Nors nustatytos ir nedidelės mikotoksinų koncentracijos silosuotose pašaruose, tačiau šie rezultatai parodė, kad yra reikalingi skринinginiai mikotoksinų tyrimai, norint išvengti galimos rizikos [10]. Remiantis tyrimų rezultatais galima teigti, kad ūkininkavimo sistema neturėjo įtakos daugiamečių žolių žaliavos ir siloso užterštumui mikroskopiniais grybais ir mikotoksinais.

4.1.3. Mikroskopinių grybų identifikavimas ir jų toksiškumo nustatymas molekuliniiais metodais

Šiuolaikiniais molekulinės diagnostikos metodais galimas greitas ir tikslus mikroorganizmų, aptinkamų silosuotose pašaruose, identifikavimas. Iki šiol nėra pakankamai išsamių duomenų apie mikroorganizmų dinamiką, jų rūšinę sudėtį silosuotose pašaruose ir jų žaliavoje priklausomai nuo silosavimui naudojamų pašarinių augalų, vietovės, klimatinų sąlygų, fermentacijos trukmės.

Richard su bendraautoriais atliktuose tyrimuose, kai iš kukurūzų siloso mėginių (11 mėnesių po fermentacijos) išskyrus galimai aflatoksikogenines mikroskopinių grybų gentis ir panaudojus genų sekas *apa* ir *ver*, gauti skirtingi rezultatai ir nenustatyti sistematiškai teigiami rezultatai visoms tirtoms gentims [134]. Šie rezultatai sutapo su Criseo rezultatais, kuriuose gauti skirtingi rezultatai tarp galimai aflatoskikogeninių mikroskopinių grybų rūšių, t. y. *A. parasiticus* ir *A. flavus* [41]. Šių mokslininkų tyrimus siūloma tęsti, naudojant molekulinius metodus, kad galima būtų identifikuoti ir diferencijuoti mikroskopinius grybus į aflatoksina sintetuojančias ir nesintetuojančias rūšis. Mūsų tyrimuose, panaudojus *apa* ir *omt* genų sekas, nustatėme, kad aflatoksikogeninėms *Aspergillus* rūšims galima priskirti tik 28,57 proc. kultūrų, kitos kultūros nėra reikšmingos šio toksino gamybai. Nustatytos aflatoksino koncentracijos kukurūzų siloso mėginiuose yra vienas iš požymių, kad mėginiai užkrėsti toksikogeniniais mikroskopiniais grybais.

Trichotecenams priskiriama didelė grupė mikotoksinių, kurių biosintezę lemia mažiausiai 24 *Fusarium* rūšys. Trichotecenų biosintezę gali lemti už tai atsakingi genai bei aplinkos sąlygos, tokios kaip aplinka, temperatūra, substratas [14]. Genai, atsakingi už trichotecenų biosintezę, lokalizuojasi *Tri* genų klasteryje. Mūsų tyrimų metu panaudojus *Tri* genų sekas nustatyta, kad 25 proc. tirtų *Fusarium* spp. kultūrų neturėjo nė vieno iš keturių genų, atsakingų už trichotecenų biosintezę.

4.2. Higieninių rodiklių koreliacija su cheminiais fermentaciniais rodikliais silosuotuose pašaruose

Pagal Chelia su bendraautoriais atliktus tyrimus, temperatūra, drėgnis, padidėjęs pH – vieni pagrindinių veiksnių, sąlygojančių mikotoksinių susidarymą. Šie veiksniai taip pat skatina ir biogeninių aminų formavimąsi silosuotose pašaruose [38, 54, 152]. Siloso žaliava mikotoksinais DON ir ZEA gali būti užteršta jau laukuose esant tam tinkamom klimatinėms sąlygom, siloso fermentacijos metu šie toksinai išlieka nepakitę. Nustatyta teigiama patikima koreliacija tarp pašaro drėgnio ir DON ($r = 0,61$), tačiau tarp drėg-

nio ir kitų toksinų ši koreliacija nustatyta neigiama AFB₁ ($r = -0,07$) ir ZEA ($r = -0,25$) [87]. Mūsų tyrimų metu taip pat nustatyta teigiama koreliacija tarp drėgnio ir DON ($r = 0,67$), bei stipri neigiama koreliacija tarp pH ir ZEA ($p < 0,05$) ir pH ir T-2 ($p < 0,05$). Pagal Cheli ir kitus, mikotoksinų metabolizmas, esant žemam pH, siloso sandėliavimo metu priklauso nuo pačių toksinų jautrumo pH, nes, skirtingų mokslinių tyrimų duomenimis, nustatytos skirtingos toksinų koncentracijos silosuotose pašaruose [38].

Biogeninių aminų kiekis didėja, mažėjant sausajai masei [152]. Mūsų tyrimuose taip pat nustatyta stipri neigiama koreliacija tarp sausos medžiagos ir tiramino bei putrescino. Amoniakinio azoto ir sviesto rūgšties kiekiai – vieni iš biogeninių aminų indikatorių. Richard su bendraautorais atliktuose tyrimuose nustatytas stiprus patikimas ryšys tarp šių rodiklių ($r = 0,67$ ir $r = 0,8$, $p < 0,05$) [134]. Taip pat ir Nishino su bendraautorais atliktuose tyrimuose nustatytas stiprus teigiamas ryšys ($r = 0,845$) tarp aminų ir amoniako kiekio silose [115]. Mūsų atliktuose tyrimuose nenustatyta koreliacija tarp šių junginių.

O'Brien su bendraautorais atliktuose tyrimuose pašarų, silosuotų į ritiesius, nustatytas didesnis užterštumas *P. roqueforti* ir *P. paneum* mikroskopiniais grybais, kai pašaruose buvo didesnis sviesto rūgšties ir propiono rūgšties kiekis. Pieno ir acto rūgštis slopinamai veikia mikroskopinių grybų augimą, tačiau propiono ir sviesto rūgštis pasižymi stipresniu inhibitoriniu poveikiu šiems mikroorganizmams. *P. roqueforti* konidijos mažiau jautrios propiono rūgšties poveikiui, lyginat su kitomis *Penicillium* rūšimis ar *Aspergillus* gentimi. Tai patvirtina, kad pokyčiai siloso fermentacijos metu svarbūs mikroskopinių grybų augimui bei vystymuisi. Nesuskilusios organinės rūgštys mikroskopinių grybų augimą slopina dėl gebėjimo prasišverbti pro jų ląstelių sienelę. Mūsų atliktų tyrimų metu nustatyta stipri koreliacija tarp pieno rūgšties ir AF (bendrai) ($p > 0,05$) bei mikotoksinų DON ir T-2/HT-2 ir tarp sviesto rūgšties bei DON ($p < 0,05$) [117]. Boudra su bendraautorais atliktuose tyrimuose nustatyta, kad kai kurie mikotoksinai gali būti dalinai suardyti tam tikrų mikroorganizmų fermentacijos metu, tačiau tam reikalingas tam tikras sausų medžiagų kiekis (nuo 280 iki 420 g/kg) bei laikotarpis (3–6 mėn.) [26, 85]. Mūsų atliktų tyrimų metu nustatyta stipri neigiama koreliacija tarp sausų medžiagų ir mikotoksinų ($p < 0,05$) bei pH ir AF (bendrai) ir ZEA. Mikotoksinų skilimas fermentacijos metu priklauso nuo toksinų jautrumo pH lygiui.

Silosavimo metu sumažėjęs baltymų kiekis, padidėjęs amino rūgščių, amoniakinio azoto kiekis gali būti vieni iš rodiklių, leidžiančių nuspėti biogeninių aminų aptikimą pašare. Biogeninių aminų susidarymas silose siejamas su baltymų skilimo procesais. Taip pat nustatyta neigiama koreliacija tarp pH sumažėjimo ir aminų susidarymo bei bendrų ir atskirų putrescino,

kadaverino ir tiramino bei amoniako ir acto rūgšties pašaruose [128, 152, 169]. Biogeninių aminų susidarymas siejamas su baltymų skilimo produktais. Mūsų tyrimų metu nustatyta stipri patikima koreliacija tarp tiramino, putrescino, kadaverino bei amoniako ($p < 0,05$), žalių baltymų ($p < 0,05$). Taip pat nustatyta stipri neigiama koreliacija tarp tiramino, putrescino, kadaverino bei sausų medžiagų kiekio. Šie rezultatai sutapo su Estijos mokslininkų atliktais tyrimais, kurių metu nustatytas didesnis biogeninių aminų kiekis drėgnuose, mažai sausų medžiagų turinčiuose silosuotose pašaruose.

Literatūroje gausu duomenų apie tai, kad pienarūgštės bakterijos yra atsakingos už biogeninių aminų gamybą fermentuotose pašaruose ir maisto produktuose. Šiuos antimitybinius junginius geba produkuoti Gram-teigiamos ir Gram-neigiamos bakterijos. Taip pat kai kurios mielių ir mikroskopinių grybų gentys dalyvauja biogeninių aminų akumuliacijoje (ypač kadaverino ir putrescino), tačiau jų vaidmuo biogeninių aminų susidaryme vis dar yra diskutuotinas ir kontraversinis [129, 165]. *Clostridium* gentys, fermentuodamos angliavandenius bei baltymus, taip pat yra atsakingos už biogeninių aminų susidarymą [57]. Mūsų atliktų tyrimų metu nustatyta silpna nepatikima koreliacija tarp biogeninių aminų ir bendro mikroskopinių grybų sporų skaičiaus bei mielių.

pH yra svarbus rodiklis fermentacijos procesui ir biogeninių aminų susidarymui, nes amino rūgščių dekarboksilazės aktyvumas yra stipresnis rūgštinėje aplinkoje [152]. Iš mūsų tirtuose mėginiuose nustatytų pH ir amoniakinio azoto vidutinių koncentracijų kukurūzų silose bei žolės silose galime spręsti apie gerą mėginių kokybę, tačiau nustatyta šių abiejų rodiklių plačios ribos, o tai gali būti vienas iš požymių, kad kai kuriuose ūkiuose silosas laikytas neteisingai.

4.3. Savikontrolės atvejais tirtų silosuotų pašarų užterštumas mikotoksinais

Visame pasaulyje mikotoksinais užteršta apie 25 proc. maisto ir pašarų žaliavos, jų produktai. FAO 2001 metų duomenimis, beveik 25–30 proc. pasaulyje surenkamo derliaus yra užkrėsta mikotoksinais. Tai sukelia nemažus ekonominius nuostolius, nes netenkama apie milijardą tonų maisto produktų per metus. 2012 metų FAO duomenimis, mikotoksinais užteršta apie 50 proc. visų pasaulyje išaugintų javų grūdų ir kukurūzų [104, 156].

Gyvulius laikant ištisus metus fermose, jie ir vasaros laikotarpiu šeriami konservuotais pašarais. Pagal Butkutės su bendraautoriais atliktus siloso laikymo trukmės tyrimus, pagrindiniai kukurūzų siloso kokybės rodikliai skyrėsi nedaug, bet ilgiau laikant silosą didėja tikimybė jam sugesti. Tą rodo padidėjęs santykinis mėginių skaičius su per aukšta pH verte, glaudžiai

susijusia su siloso fermentacijos rodikliu, kuris yra pašaro saugos ir stabilumo požymis. Atliktų tyrimų metu 2011–2015 metais nustatytos mikotoksinų koncentracijos, jų aptikimo dažnis – skirtingas kiekvienais metais, nes šių toksinų susidarymui įtakos gali turėti ir klimatinės sąlygos. Aflatoksino susidarymą predisponuoja karštas ir sausas oras, o ZEA ir DON – vėsus ir drėgnas klimatas. Nepaisant taikomų prevencinių priemonių, tokių kaip atsparių augalų veislių sukūrimo, taikant tinkamus agronominius metodus, mikotoksinų koncentracijas, aptinkamas augalinėse žaliavose, gali nulemti ir kasmetiniai klimatiniai pokyčiai [29, 126].

Lietuvos klimato sąlygomis tinkamiausias laikas silosuoti kukurūzus yra spalio 6–10 dienos, o jei meteorologinės sąlygos tinkamos – ir vėliau [30]. Viena iš kukurūzų kokybės, tuo pačiu ir higieninės kokybės įvairavimo priežasčių gali būti kasmet skirtingos meteorologinės sąlygos kukurūzų bei kitų žolinių augalų vystymosi ir brandimo periodu bei nuėmimo metu.

Mūsų tyrimų metu didžiausias mikotoksinų kiekis kukurūzų silose, paimtame po 1–2 mėn. po sudėjimo, buvo nustatytas 2015 metais. Kukurūzų grūdais šiuo laikotarpiu nebuvo tirtas. Lyginat su kitais tyrimų metais, 2015 metai buvo šilčiausi (daugelyje rajonų 2,9–3,8 °C aukštesnė už standartinę klimato normą (SKN)) ir sausiausi (rugpjūčio mėnesį didesnėje šalies dalyje per mėnesį kritulių iškrito 2–16 mm (3–20 proc. SKN), rugsėjo mėnesį vidutinis kritulių kiekis ženkliai padidėjo – didesnėje šalies dalyje per mėnesį kritulių iškrito 55–80 mm (beveik SKN), o temperatūra daugelyje rajonų 1,5–2 °C aukštesnė už SKN. Derliaus nuėmimo metu, t. y. spalio mėnesį, vidutinė oro temperatūra 1–2 °C žemesnė už SKN, o kritulių kiekis 10–20 proc. žemesnis už SKN. Tokie nepastovūs orai kukurūzų brandos tarpsnyje bei pjūties metu galėjo lemti palankias sąlygas didesnėms mikotoksinų koncentracijų susidarymui.

Pjūties brandą kiekvienais metais žolės pasiekia nevienodai. Dažniausiai tai būna gegužės mėnesio pabaiga-birželio pradžia. Siekiant paruošti geros kokybės silosą, rekomenduojama žolę pjauti, vytinti ir silosuoti esant tinkamoms meteorologinėms sąlygoms. Savo atliktuose tyrimuose ieškojome ryšio tarp mikotoksinų koncentracijų ir oro sąlygų pjūties metu. Pagal hidrometeorologinius duomenis, 2015 metai, lyginant su kitais mūsų tyrimų metu analizuotais metais, vasaros laikotarpiu (birželio-rugpjūčio mėn.) buvo sausiausi, t. y. vidutinis kritulių kiekis – 51,77 mm ir vėsiausi, t. y. vidutinė oro temperatūra 16,8 °C. Šiais metais, nustatyta didžiausia vidutinė ZEA koncentracija 1150 µg/kg žoliniuose pašaruose, silosuotose į ritinius. 2011 metais vasaros laikotarpiu vidutinė oro temperatūra buvo 18,5 °C, o vidutinis iškritusių kritulių kiekis – 117,7 mm, tai šilčiausias ir drėgniausias laikotarpis mūsų tyrimų metu. Tais metais tirtų į ritinius silosuotų pašarų užterš-

tumas mikotoksinu ZEA pats mažiausias, t. y. 590 µg/kg, taip pat, lyginat su kitais metais, nustatytas nedidelis užterštumas DON.

Dėl nedidelio kiekvienos grupės mėginių skaičiaus sunku daryti apibendrinančias išvadas, vertinant meteorologinių sąlygų įtaką mikotoksinų susidarymui. Kitos priežastys, galėjusios lemti tirtų silosuotų pašarų užterštumą mikotoksinais, tai augalų vegetacijos tarpsnis, pjovimo technologijos (vengiant žaliavos užteršimo žemėmis), silosuojamos žaliavos drėgmė, cheminė sudėtis, silosuojamos masės [30]. O'Brien su bendrautoriais atliktuose tyrimuose nustatytas pašarų, silosuotų į ritinius, didesnis užterštumas *P. roqueforti* ir *P. paneum* mikroskopiniais grybais, kai siloso žaliava supta į ritinius sausu periodu [117].

Dėl mikotoksinų skirtingų koncentracijų skirtingais metais labai svarbus vaidmuo tenka meteorologinėms sąlygoms, tad galimi ateities klimato pokyčiai gali pakeisti ir šių nepageidaujamų toksinų junginių koncentracijas.

4.4. Silosuotų pašarų, užterštų mikotoksinais, citotoksiškumo įvertinimas organų taikinių ląstelių kultūroms

Daug tyrimų atlikta norint įvertinti trichotecenų bei kitų mikotoksinų citotoksinį poveikį žmonių ir gyvūnų ląstelių linijoms. Apžvelgiant šiuos tyrimus pastebimi akivaizdūs skirtumai, nors tyrimams naudoti tie patys toksinai ir ląstelių linijos. Calvert su bendrautoriais atliktuose tyrimuose nustatyta, kad HeLa ląstelių linija jautriausia trichotecenų poveikiui [32]. Kita mokslininkų grupė nustatė palyginti nedidelį jautrumą šioms ląstelėms. Šiems rezultatų skirtumams įtakos galėjo turėti skirtingos eksperimentų sąlygos, pasirinkti metodai citotoksiškumui įvertinti. Vienas iš mūsų išsikelto uždavinių – įvertinti *Aspergillus* ir *Fusarium* produkuojamų mikotoksinų AFB₁, DON ir ZEA, Lietuvoje didžiausių pašaruose nustatomų koncentracijų, citotoksinį poveikį pasirinktoms organų taikinių ląstelių linijoms.

Ląstelių proliferacijos tyrimai plačiai naudojami onkologijoje vertinant vėžinių ląstelių dauginimąsi po spindulinio ar chemoterapinio poveikio [170]. Norint įvertinti mikotoksinų mišinių citotoksinį poveikį pasirinktoms ląstelių kultūroms, pirmaisiai būtina nustatyti atskirų toksinų poveikį šioms ląstelėms. Todėl mūsų atliktų tyrimų metu įvertinta Lietuvoje didžiausių nustatytų mikotoksinų ir jų mišinių koncentracijų silosuotose pašaruose citotoksinis poveikis pasirinktų organų taikinių ląstelių linijų proliferacijai ir apoptozei veikiant jas 24 val., 48 val., ir 72 val.

Atliktų tyrimų duomenimis nustatyta, kad Lietuvoje silosuotose pašaruose aptiktos didžiausios mikotoksinų koncentracijos turi citotoksinį poveikį ląstelių apoptozei bei proliferacijai neįvertinat ar šis poveikis yra sinergis-

tinis ar adityvus. ZEA yra nesteroidinis estrogeninis mikotoksinas, pasižymintis hepatotoksiniu, imunotoksiniu, genotoksiniu poveikiu. Jo mutageninis ir karcinogeninis poveikis iki šiol yra kontraversinis. Mūsų atliktų tyrimų metu paveikus ląsteles didžiausia tirta ZEA koncentracija nepastebėtas neigiamas poveikis jų proliferacijai. Aflatoksinais – vieni pagrindinių mikotoksinių, sukeliančių širdies ir kraujagyslių pakitimus dėl DNR pažeidimų. Mūsų atliktų tyrimų metu nustatyta, kad AFB₁ stipriausiai slopino PKEL ląstelių proliferaciją. Abass ir jo bendraautoriai, naudodami žmogaus gaubtinių žarnų karcinomos ląsteles (HCT116), nustatė, kad ZEA ir AFB₁ slopina ląstelių proliferaciją, tačiau ūmus citotoksinis poveikis yra žemas [2]. Panaudojus metileno mėlynąjį, nustatyta AFB₁ IC₅₀ apie 180 μM ląstelėms HCT 116. ZEA ir AFB₁ poveikis HCT 116 ląstelių proliferacijai koncentracijomis nuo 1 nM iki 1 μM pastebėtas po 120 val. ZEA sukeltas didžiausias proliferaciją slopinantis poveikis HCT 116 ląstelėms 10 kartų žemesnis nei AFB₁. Wan su bendraautoriais atliktuose tyrimuose, įvertinus *Fusarium* mikotoksinių citotoksinį poveikį IECs (žarnų epitelio ląstelės) ląstelėms, nustatytas maksimalus poveikis ląstelių gyvybingumui, kai po 48 val. išliko gyvybingų 28 proc. ląstelių, paveikus jas DON 590 ng/g (590 μg/kg; 2 μM). Nustatytas IC₅₀, kai DON 540 ng/g (540 μg/kg; 1,83 μM). Šių tyrimų metu, paveikus IECs (žarnų epitelio ląstelės) ZEA 10 μM (3200 μg/kg) koncentracija, pastebėtas patikimas ląstelių gyvybingumo padidėjimas ir sumažėjimas, paveikus ZEA 40 μM (12700 μg/kg) [175]. Mūsų atliktų tyrimų metu nustatyta, kad grynas DON pasižymėjo didesniu citotoksiniu poveikiu negu mišiniuose slopindamas inkstų ir endotelio ląstelių proliferaciją.

Vienas iš mikotoksinių biologinių poveikio žmogui ar gyvūnui – apoptozės sukėlimas. Yra atlikta nemažai tyrimų su žinduolių limfocitais ir ląstelių linijomis, norint įvertinti šių junginių poveikį ląstelių gyvybingumui ir proliferacijai. Mikotoksinių toksinis poveikis biomolekuliniame lygyje gali būti siejamas su mikotoksinių koncentracijomis, nuo kurių priklauso ir ląstelių apoptozė [148]. Mūsų tyrimuose nustatytas tiesioginius ryšys tarp mikotoksinių koncentracijos, poveikio trukmės ir ląstelių apoptozės. Tyrimai atlikti naudojant kristal violetinį dažą. DON sukėlė daugiau nei 50 proc. BHL-21 ir PKEL ląstelių apoptozę po 72 val. Kitų autorių teigimu, mikotoksinu DON paveikus Caco-2 ląstelių kultūras (heterogeninės, žmogaus žarnų epitelio adenokarcinomos ląstelės) 0,01–0,05 μM (3–15 ng/ml) koncentracijomis, ląstelių apoptozės nesukėlė [148]. Aflatoksinas B₁ – vienas toksiškiausių mikotoksinių, žinomas kaip kancerogenas. AFB₁ dažniausiai pažeidžia kepenų ląsteles, tačiau gali sukelti ir instų pakitimus. Mūsų atliktų tyrimų metu nustatyta, kad šis toksinas sukėlė apoptozę daugiau nei 50 proc. po 72 val. BHL-21 ir MH-22A ląstelėms.

Nors yra vadovaujamas nuomone, kad atrajotojai dėl prieskrandžių mikrofloros yra mažiau jautrūs neigiamam mikotoksinų poveikiui nei monogastriniai gyvūnai, tačiau visiškas mikotoksinų skaidymas ir detoksikacija priklauso nuo įvairių faktorių, vienas jų – pašarų racioną sudarančių koncentruotų ir stambųjų pašarų santykis. ZEA yra pakankamai lengvai rezorbuojamas iš virškinamojo trakto ir dalinai metabolizuojamas prieskrandžio pirmuonių į α -zearalenolį ir β -zearalenolį. Tačiau šie mikotoksinai nėra visiškai suskaidomi, tad nedidelėmis koncentracijomis juos galime aptikti mėsoje, piene, kraujo serume [99]. ZEA sukelia oksidacinius pažeidimus ir genotoksinį poveikį žinduolių ląstelėse – chromosomų aberacijas, mikroranduolių, DNR fragmentaciją ir indukciją. Pagal Sobrovos su bendraautoriais atliktus tyrimus, DON gali sukelti chromosomų aberacijas, dažniausiai chromatidžių trūkius. Toksinis DON poveikis pasireiškia dėl jo gebėjimo jungtis prie eukariotų ribosomų ir sužadinti per mitogeno aktyvuotą proteinkinazę „ribotoksinis streso atsakas“, o AFB₁ verčiamas į epoksidinę formą AFB-NT-guanino aduktorius, kas sukelia DNR grandinės trūkius bei mutacijas. Todėl savo tyrimuose įvertinome galimą genotoksinį mikotoksinų poveikį karvių limfocitų ląstelėms, t. y. paveikus pieninių karvių limfocitų ląsteles, mikotoksinų AFB₁, ZEA, DON ir ZEA/DON koncentracijomis, didžiausiomis Lietuvoje nustatytomis silosuotose pašaruose, nustatyta, kad chromosominių aberacijų dažniai skyrėsi tarp mikotoksinais užterštų ir kontrolinių mėginių. Didžiausias bendras ląstelių skaičius su pakitimais nustatytas paveikus limfocitų ląsteles ZEA mikotoksinu, taip pat nustatyti chromosomų skaičiaus pakitimai (aneuploidija), dėl ZEA poveikio. Lioi su bendraautoriais atliktuose tyrimuose, įvertinat ZEA genotoksinį poveikį galvijų limfocitams, nustatyti statistiškai patikimi pakitimai chromosomose, kai ZEA sukeltas citogenetinis poveikis nepriklausė nuo mikotoksinų koncentracijos [99]. Tačiau pastebėtos chromosomų aberacijos ir kontrolinėje grupėje, to priežastis galėjo būti daugelis faktorių, tokių kaip stresas, aplinkos poveikis, su pašaru patekusios įvairios medžiagos.

Laboratoriniai tyrimai *in vitro* – tinkamas metodas toksikologiniam poveikiui įvertinti, panaudojant mielių ląsteles, žinduolių audinių kultūrų ląsteles ar bakterijas. Lyginant su atliekamais tyrimais *in vivo*, tai greitesnis ir pigesnis metodas, tačiau šie du metodai gali parodyti skirtingus rezultatus dėl to, kad, atliekant tyrimus *in vitro*, neįvertinamas viso organizmo atsakas. Citotoksiškumo tyrimai *in vitro* gali būti naudojami kaip skринinginiai tyrimai ūmiam toksiškumui įvertinti [19, 64, 73].

4.5. Natūraliai mikotoksinais užterštų pašarų poveikis melžiamoms karvėms ir detoksikuojančių preparatų efektyvumo įvertinimas

Melžiamų karvių dienos racioną, daugiau nei 70 proc., sudaro koncentruoti pašarai, kurie gali būti kontaminuoti daugiau nei vienu mikotoksinu. Silosuoti pašarai, ypač juos sandėliuojant ilgą laiką, taip pat gali būti užteršti šiais nepageidaujamaisiais toksiniais junginiais. Atrajotojai yra vieni atspariausių gyvūnų neigiamam mikotoksinų poveikiui. Tačiau ilgą laiką juos šeriant pašarais, užterštais mažomis koncentracijomis mikotoksinais, gali būti pastebėtas neigiamas poveikis produktyvumui ir gyvūnų sveikatingumui.

Nedaug yra atlikta mokslinių tyrimų apie *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* produkuojamų mikotoksinų ir jų sinergetinį poveikį melžiamų karvių produktyvumui, hematologiniams ir biocheminiams kraujo rodikliams. Nedideliais toksinų kiekiais ilgą laiką šeriant gyvulius, pastebėti ne specifiniai simptomai, tokie kaip susilpnėjusi imuninė sistema, padidėjęs sergamumas infekcinėmis ligomis, medžiagų apykaitos ir hormoniniai sutrikimai [109].

Mycofix Plus (Biomin GmbH, Herzogenburg, Austria) yra vienas iš keleto produktų, skirtų mikotoksinų poveikio neutralizavimui pašaruose. Šis mikotoksinų neutralizatorius įmaišomas į gyvulių pašarą (paros dozė nuo 15 iki 40 mg gyvuliui, priklausomai nuo pašarų užterštumo mikotoksinais). Šio produkto sudėtis ir veikimas pagrįsti mikotoksinų cheminėmis ir fizikinėmis savybėmis. Poliniai mikotoksinais (aflatoksinais) gali būti adsorbuojami neorganinių medžiagų, tokių kaip bentonito ir diatomito mišinio. Trichotecenai, ZEA, kurie blogai adsorbuojasi, biotransformuojami *Eubacterijų* padermių (BBSH 797), *Trichosporon* genčių. Fitofitinės medžiagos, išskirtos iš jūros dumblių (*Ascophyllum nodosum*), ir tikrojo margenio (*Silybum marianum*) ekstraktas mažina mikotoksinų toksinį poveikį [86].

Iškelta hipotezė, kad į raciono sudėtį įtraukus mikotoksinius neutralizuojantį preparatą padidės pieno primilžis, taip pat dėl didesnio pašarų suvartojimo sumažės mikotoksinų neigiamas poveikis didžiajame prieskrandyje ir imuninei sistemai. Mūsų atliktų tyrimų metu poveikis didžiajam prieskrandžiui netirtas, tačiau didesnis pieno primilžis nustatytas eksperimentinėje nei kontrolinėje grupėje. Taip pat nustatytas didesnis IgA kiekis eksperimentinėje grupėje bandymo pabaigoje, kontrolinėje grupėje šis rodiklis sumažėjo. Šie tyrimai sutampa ir su Korostelevos su bendraautoriais atliktuose tyrimuose, kai IgA sumažėjo karvių kraujo serume šeriant pašarais, kontaminuotais DON, ZEA ir 15-acetyl DON mikotoksinais. Pasak jų, IgA sumažėjimas kraujo serume – tai *Fusarium* produkuojamų toksinų imunosupresinis poveikis [90]. Tyrimų metu nustatytas mažesnis somatinių

ląstelių kiekis eksperimentinių karvių grupėje, kas parodo, kad mikotoksinus detoksikuojantis priedas teigiamai veikė tešmens sveikatingumą.

4.6. Augalinių ekstraktų, kaip profilaktinių priemonių, panaudojimas, gerinant siloso higieninę kokybę

Mokslinės literatūros duomenims, augaliniai ekstraktai, turintys savo sudėtyje fenolinių junginių, ypač timolio ir karvakrolio, gali turėti įtakos pašarų epifitinei mikroflorai, tokiai kaip mikroskopiniai grybai, mielės, slopinant jų aktyvumą ir taip pagerinat pašaro higieninę kokybę.

Skirtingos čiobrelio rūšys gali būti naudojamos kaip naturalūs konservantai ir fungicidai, jų antigrybį poveikį lemia biologiškai aktyvios medžiagos, kurios tarp augalų rūšių gali skirtis savo sudėtimi ir koncentracijomis, kaip pavyzdžiui, *T. vulgari* nustatyta didžiausia šių junginių koncentracija timolis (48,9 proc.) and p-cymene (19 proc.), tuo tarpu *T. tosevi* – karvakrolis (12,8 proc.), α -terpinyl acetatas (12,3 proc.), cis-myrtanolis (11,2 proc.). Razzaghi-Abyaneh su bendraautoriais nustatė *T. vulgari* slopinantį poveikį *A. parasiticus* rūšiai. Raudonėlio dvi pagrindinės biologiškai aktyvios medžiagos, t. y. karvakrolis ir timolis, pasižymėjo, adityviu poveikiu prieš *S. aureus* ir *P. aeruginosa* [96,131].

Kukurūzų silosas pasižymi išskirtinai geromis silosavimosi savybėmis dėl pakankamo sausųjų medžiagų kiekio, žemos buferinės gebos ir pakankamo tirpių angliavandenių kiekio. Tačiau, nepaisant gerų fermentacinių savybių, didelio pienarūgščių bakterijų kiekio, žemo lakiųjų rūgščių kiekio, kukurūzų silose dažnai nustatomas aerobinis gedimas. Aerobinio gedimo intensyvumas priklauso nuo nepageidaujamų mikroorganizmų kiekio silose, jų aktyvumo. Aerobinis siloso gedimas gali atsirasti pažeidus siloso gamybos ar sandėliavimo procesus arba pradėjus silosą naudoti šėrimui, kai suaktyvėja nepageidaujami aerobiniai mikroorganizmai. Siloso aerobinio gedimo metu suaktyvėja oksidaciniai procesai, pieno rūgštis, vandenyje tirpūs angliavandeniai skaidomi į anglies dioksidą ir vandenį, mažėja maistinė vertė [177, 178]. Siloso fermentaciniam procesui pagerinti naudojama daug biologinių ir cheminių siloso inokulantų. Jie padeda palaikyti aerobinį stabilumą, slopina nepageidaujamų mikroorganizmų, tokių kaip mielės ir mikroskopiniai grybai, vystymąsi. Organinės rūgštys, ypač – skruzdžių rūgštis, pasižymi stipriu antibakteriniu poveikiu [150].

Mūsų tyrimuose į silosuojamą kukurūzų žaliavą įterpti čiobrelio ir raudonėlio vandeniniai ir ethanoliniai ekstraktai tam, kad įvertintume jų antimikrobinį poveikį. Juose nustatytos skirtingos timolio ir karvakrolio koncentracijos. Raudonėlio vandeniniuose ekstraktuose ir čiobrelio ekstrakto (C-VE-25) šių medžiagų neaptikta. Galucci su bendraautoriais atliktuose

moksliniuose darbuose karvakrolis, eugenolis, linalolis, cinamomo aldehidai, timolis pasižymėjo stipriu antimikrobiniu poveikiu daugeliui mikroorganizmų [66]. Iš mūsų gautų duomenų matome, kad didžiausias mikroskopinių grybų skaičius – kontroliniame mėginyje (K), o bendras bakterijų skaičius (KS) mėginiuose. Soyacan-Önenç su bendraautoriais darbuose raudonėlio eteriniame aliejuje, nustatė 59,3 proc. karvakolio ir 12,04 proc. timolio ir įterpus jį į silosuojamą pašarą, padidėjo pH, sumažėjo CO₂ ir mikroskopinių grybų skaičius [150]. Tirtuose mėginiuose nustatytas AFB₁ kiekis neviršijo ES reglamentuojamų kiekių, t. y. pagal Komisijos (2003/100/EB) direktyvą, AFB₁ melžiamų atrajotojų visose pašarinėse žaliavose negali būti daugiau nei 5 µg/kg, kitų atrajotojų < 50 µg/kg. Pagal Komisijos Rekomendaciją (ES) 2016/1319 melžiamoms karvėms ZEA – 500 µg/kg, o grūduose ir grūdų produktuose – 3000 µg/kg. Nežymiai ši rekomendacija viršyta mėginiuose su raudonėlio vandeniniu ekstraktu (R-VE-25) ir siloso inokuliantu (KC). DON didžiausia koncentracija nustatyta kontroliniame mėginyje (K), tačiau DON koncentracija grūduose ir grūdų produktuose pagal Komisijos Rekomendacijos (ES) 2016/1319 – 8000 µg/kg, o kombinuotame pašare, skirtame galvijų prieaugliui iki 4 mėn. amžiaus, 2000 µg/kg.

Mūsų atliktų bandymų metu žemiausias pieno rūgšties kiekis, aukščiausias acto rūgšties ir amoniakinio azoto kiekis nustatytas raudonėlio vandeniniame ekstrakte (R-VE-25), tai rodo prastą mėginio fermentaciją. Mėginiuose su biologiniais inokuliantais ir raudonėlio etanoliniu ekstraktu (R-EE-50) nustatytas žemas amoniakinio azoto kiekis. Pienarūgštės bakterijos, įeinančios į biologinių inokuliantų sudėtį, greitina pH sumažėjimą, didina pieno ir acto rūgščių santykį, mažina etanolio ir amoniakinio azoto susidarymą. Driehuis su bendraautoriais nustatė neigiamą pienarūgščių bakterijų poveikį mikroskopinių grybų augimui ir dauginimuisi aerobinių sąlygų metu bei aerobinio gedimo metu [50]. Galima daryti išvadą, kad raudonėlio etanolinis ekstraktas (R-EE-50) teigiamai veikė siloso fermentaciją.

Silosuotų pašarų higieninei kokybei pagerinti panaudoti *T. vulgaris* ir *O. vulgare* vandeniniai ir etanoliniai ekstraktai. Šiuos rezultatus įvertinti ir interpretuoti buvo sunku, nes tai – vieni pirmųjų darbų. Tačiau tikimės, kad jie sukels diskusijas ir bus pratęsti tolimesnėse studijose, įvertinant įvairių vaistinių-priekoninių augalų ekstarkų panaudojimą silosuotų pašarų kokybei gerinti, įvertinant jų ekonominius kaštus, galimą poveikį gyvūno sveikatingumui bei produkcijos kokybei.

IŠVADOS

1. Ištirus Lietuvoje užaugintos kukurūzų žaliavos ir iš jos pagaminto siloso higieninę kokybę nustatyta:
 - 1.1. Kukurūzų žaliavoje didžiausias mikroskopinių grybų, sudarančių kolonijas, skaičius (4,65 log ksv/g), tačiau silose, paimtame po 8 mėn. po sudėjimo, jų sumažėjo 17,49 proc. ($p < 0,05$). Mažiausias mielių kolonijų skaičius – žaliavoje (4,46 log ksv/g), o silose, paimtame po 8 mėn. po sudėjimo, padidėjo 42,27 proc. *L. monocytogenes* daugiausiai aptikta kukurūzų žaliavos mėginiuose. Vienodame mėginių skaičiuje žaliavos ir silose, paimtame po 8 mėn. po sudėjimo, aptikta *C. perfringens*.
 - 1.2. Kukurūzų žaliavoje ir silose, paimtame po 3 mėn. po sudėjimo, išskirta ir identifikuota 12 mikroskopinių grybų rūšių, o silose, paimtame po 8 mėn. po sudėjimo, identifikuotos 8 mikroskopinių grybų rūšys. Žaliavoje vyravo *Alternaria* spp. (išskirta ir identifikuota 77,17 proc.), *Fusarium* spp. (37,54 proc.), *Aspergillus* spp. (14,49), *Penicillium* spp. (0,89 proc.). Silose, paimtame po 3 mėn. po sudėjimo, sumažėjo *Alternaria* spp. 99,88 proc. ($p < 0,05$), *Fusarium* spp. 98,85 proc., tačiau 46 kartais ($p < 0,05$) padidėjo *Aspergillus* spp. ir 28 kartais *Penicillium* spp. ($p < 0,05$). Silose, paimtame po 8 mėn. po sudėjimo, lyginant su žaliava, *Aspergillus* spp. padidėjo 81 kartą ($p < 0,05$), o *Penicillium* spp. – 8 ($p > 0,05$) kartais.
 - 1.3. Didžiausios vidutinės ZEA (880,40 $\mu\text{g/kg}$), DON (2600,00 $\mu\text{g/kg}$) OTA (29,15 $\mu\text{g/kg}$) koncentracijos nustatytos kukurūzų silose, paimtame po 3 mėn. po sudėjimo. T-2/HT-2 (147,25 $\mu\text{g/kg}$) ir AF (bendrai) (20,05 $\mu\text{g/kg}$) – silose, paimtame po 8 mėn. po sudėjimo. Gliotoksino aptikta 3,2 proc. didesniame mėginių skaičiuje kukurūzų silose, paimtame po 3 mėn. po sudėjimo. Biogeninių aminių didžiausios koncentracijos nustatytos siloso mėginiuose, paimtuose po 3 mėn. po sudėjimo.
2. Ištirus Lietuvoje užaugusių daugiamečių žolių ir iš jų pagaminto bei į ritinius susukto siloso iš ekologinių ir įprastinių ūkių higieninę kokybę, nustatyta:
 - 2.1. Patikimas didžiausias mikroskopinių grybų ir mielių skaičius žaliavose, kuris sumažėjo silose, paimtame po 8 mėn. po susukimo į ritinius. Žaliavos mėginiuose iš ekologinių ūkių nustatytas didesnis

- mikroskopinių grybų ir mažesnis mielių skaičius, lyginat su įprastinės gamybos ūkių mėginiais. Didesniame mėginių kiekyje iš įprastinės gamybos ūkių aptikta *L. monocytogenes* ir vienodai *C. perf-ringens*.
- 2.2. Žaliavoje iš ekologinių ūkių, lyginant su įprastinės gamybos ūkiais, nustatytas didesnis 20 proc. *Alternaria* spp. ($p > 0,05$), 4 proc. *Fusarium* spp. ($p > 0,05$). Silose, paimtame po 8 mėn. po susukimo į ritinius, iš ekologinių ūkių, lyginant su įprastinės gamybos ūkiais, nustatytas 53,00 proc. didesnis *Aspergillus* spp. ($p > 0,05$), 2 kartus didesnis *Penicillium* spp ($p > 0,05$).
- 2.3. Didžiausios vidutinės mikotoksinų koncentracijos DON (215 $\mu\text{g/kg}$), AF (bendras) (1,04 $\mu\text{g/kg}$) nustatytos daugiamečių žolių žaliavoje iš ekologinių ūkių, o ZEA (361 $\mu\text{g/kg}$) iš įprastinės gamybos ūkių. Daugiamečių žolių silose, susuktame į ritinius, didžiausios vidutinės mikotoksinų koncentracijos nustatytos: DON (327,5 $\mu\text{g/kg}$), iš įprastinės gamybos ūkių, o ZEA (391 $\mu\text{g/kg}$), T-2/HT-2 (112,3 $\mu\text{g/kg}$) AF (bendras) (30,68 $\mu\text{g/kg}$) – iš ekologinių ūkių. Gliotoksino aptikta 20 proc. didesniame siloso mėginių skaičiuje iš ekologinių ūkių. Silose iš ekologinių ūkių, lyginant su įprastinės gamybos ūkiais, nustatyta mažesnė biogeninių aminų histamino, putrescino ir kadaverino, tačiau didesnė tiramino koncentracija.
3. Nustatytos koreliacijos tarp higieninių ir cheminių fermentacinių rodiklių:
- 3.1. Kukurūzų žaliavoje – stipri neigiama koreliacija ($p < 0,05$) tarp mikotoksinų ZEA, T-2/HT-2 koncentracijų bei pH. Kukurūzų silose, paimtame po 3 mėn. po sudėjimo, nustatytos stiprios neigiamos koreliacijos tarp mikotoksinų ZEA ir pH; ZEA ir pieno rūgšties bakterijų; AF (bendras) ir amoniako. Silose, paimtame po 8 mėn. po sudėjimo, stiprios neigiamos koreliacijos ($p < 0,05$) nustatytos tarp ZEA, T-2/HT-2 ir pH; stiprios teigiamos koreliacijos ($p < 0,05$) tarp DON ir SM; OTA ir pieno rūgšties bakterijų; T-2/HT-2 ir pieno rūgšties bei sviesto rūgšties; AF (bendras) ir propiono rūgšties.
- 3.2. Daugiamečių žolių silose ritiniuose – stiprios neigiamos koreliacijos ($p < 0,05$) tarp mikotoksinų AF (bendrai), ZEA ir SM; AF (bendrai), ZEA ir pH. Stipri teigiama koreliacija ($p < 0,05$) tarp tiramino, putrescino, kadaverino, ir amoniako; stipri neigiama ($p < 0,05$) tarp tiramino ir SM; tarp kadaverino ir SM; tarp tiramino, putrescino, kadaverino ir žalių baltymų.

4. 2011–2015 metais Gyvūnų gerovės tyrimų laboratorijoje savianalizės ir probleminiais atvejais tirtuose silosuotose pašaruose iš įvairių Lietuvos ūkių nustatytos vidutinės mikotoksinų koncentracijos variavo: AFB₁ (0,65–13 µg/kg), DON (200–750 µg/kg), ZEA (180–2000 µg/kg).
5. Nustatyta, kad, paveikus organų taikinių ląstelių linijas kristaliniais mikotoksinais, didžiausiomis Lietuvoje nustatytomis mikotoksinų koncentracijomis (AFB₁ (8,5 µg/l), DON (1250 µg/l), ZEA(1560 µg/l)), ląstelių proliferaciją stipriausiai slopino: AFB₁ – PKEL ląstelių liniją po 72 val. ($p < 0,05$), DON – BHL-21 ($p < 0,05$) ir PKEL ($p < 0,05$) ląstelių linijoms po 72 val. Palyginus atskirų kristalinių mikotoksinų ir jų mišinių poveikį ląstelių kultūroms, nustatytas didžiausias proliferaciją slopinantis poveikis po 72 val. DON/ZEA – BHL-21 ($p > 0,05$), AFB₁/DON/ZEA – MH-22A ($p < 0,05$), o AFB₁/ZEA – HeLa ($p < 0,05$) ir PKEL ($p < 0,05$) ląstelių linijoms. Nustatyta, kad natūraliai mikotoksinais DON, ZEA, AFB₁, T-2 užterštų pašarų ekstraktai stipriausiai slopino PKEL ląstelių linijos proliferaciją.
6. Ilgą laiką šeriant melžiamas karves pašarais, natūraliai užterštais Lietuvoje dažniausiai aptinkamomis *Fusarium* spp. ir *Aspergillus* spp. produkuojamomis mikotoksinų koncentracijomis, pastebėti pieno cheminės sudėties pokyčiai, somatinių ląstelių kiekio padidėjimas ir IgA sumažėjimas. Detoksikuojantis preparatas MycofixPlus 3 sumažino šį neigiamą poveikį.
7. Raudonėlio ir čiobrelis etanoliniai ekstraktai, įterpti į kukurūzų silosą, sumažino mikroskopinių grybų skaičių, bendrą bakterijų skaičių, DON ir T-2 koncentracijas.

REKOMENDACIJOS

1. Rekomenduojame silosuotame pašare 3–8 mėn. po sudėjimo ar susukimo į ritinius nustatyti mikroskopinių grybų ir mielių kolonijų skaičių tam, kad būtų galima įvertinti pašaro aerobinį stabilumą bei galimą užterštumą jų antriniais metabolitais.
2. Siūlome atlikti skринinginius mikotoksinų tyrimus silosuojamoje žaliavoje ir silose skirtingais periodais po sudėjimo ar susukimo, nes mūsų tyrimų duomenimis, tirta žaliava yra užsikrėtusi *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. ir kitomis galimai toksikogeninėmis gentimis, taip pat aptikti mikotoksinais.
3. Kadangi mikotoksinų tyrimai yra pakankamai brangūs, organų taikinių įvairių ląstelių linijų testai gali būti naudojami pašaro toksiškumui įvertinti.
4. Net ir taikant geros gamybos praktiką neišvengiama mikotoksinų susidarymo silosuotuose pašaruose. Todėl siūlome į pašarus įterpti detoksikuojančių preparatų. Prieš įterpiant į pašarus detoksikuojančius preparatus svarbu nustatyti jų panaudojimo tikslingumą, t. y. rekomenduojame įterpti į pašarus esant tokioms mikotoksinų koncentracijoms: AFB₁ > 5 µg/kg, ZEA > 600 µg/kg, DON > 600. Detoksikuojančius preparatus pasirinkti naujos kartos, kaip mūsų naudotas Mycofix Plus 3.E, kuris turėtų ne tik absorbcinę, bet ir biologinę, fermentinę, imunitetą stimuliuojančią grupę.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Abbas HK, Yoshizawa T, Shier TS. Cytotoxicity and phytotoxicity of trichothecene mycotoxins produced by *Fusarium* spp. *Toxicon* 2013;74:68-75.
2. Abbas HK, Bellaloui N, Bruns HA. Investigating Transgenic Corn Hybrids as a Method for Mycotoxin Control. *Food and Nutrition Sciences* 2016;7:44-54.
3. Abid-Essefi S, Ouane Z, Hassen W, Baudrimont I, Creppy E, Bacha H. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology in vitro* 2004;18(4):467-474.
4. Akande KE, Abubakar MM, Adegbola TA, Bogoro SE. Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feed: a review. *Pakist J Nutrit* 2006;5:398-403.
5. Al-Anati L, Petzinger E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *J vet Pharmacol Therap* 2006;29:79-90.
6. Alonso VA, González Pereyra ML, Armando MR, Dogi CA, Dalcero AM, Rosa CAR, Chiacchiera SM, Cavaglieri LR. Silage Contribution to Aflatoxin B1 Contamination of Dairy Cattle Feed, Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. In: Torres-Pacheco I, editor. InTech; 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detection-measurement-and-control/silagecontribution-to-aflatoxin-b1-contamination-of-dairy-cattle-feed>
7. Anonymous. Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung. *Bundesgesetzblatt* 2004;151-152.
8. Antonissen G, Martel A, Pasmans F, Ducatelle R, Verbrugghe E, Vandenbroucke V, Li S, Haesebrouck F, Immerseel FV, Croubels S. The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins* 2014;6:430-452.
9. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, International. 2005.
10. Aragon YA; Rodrigues I; Hofstetter U, Binder EM. Mycotoxins in silage: occurrence and prevention. *Iran J Appl Anim Sci* 2011;1(10): 2011.
11. Aschenbach JR, Gäbel G. Effect and absorption of histamine in sheep rumen: significance of acidotic epithelial damage. *J Anim Sci* 2000;78: 464-470.
12. Auerbach H. Mould growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions 2006. Available at : <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins>
13. Aziz M, Karboune S. Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2016;7:357-379.
14. Bakan B, Melcion D, Richard-Molard D, Cahagnier B. Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50(4):728-731.
15. Baliukonienė V, Bakutis B, Vaivadaitė T, Bartkienė E, Jovaišienė J. Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika (Vet Med Zoot)*. 2012;59 (81):3-9
16. Baranauskas S, Juknevičius S, Stankevičiūtė J. Pašarai ir galvijų šėrimas. *Mokomoji knyga*; 2009. p. 9
17. Barug D. The mycotoxin factbook: food & feed topics. Wageningen Academic Pub, 2006.

18. Bernhoft A, Clasen PE, Kristoffersen AB, Torp M. Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Additives and Contaminants* 2010;27:842–852.
19. Bin-Umer MA, McLaughlin JE, Basu D, McCormick S, Tumer NE. Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation – implication for the mechanism of toxicity. *Toxins* 2011;3(12):1484–1501.
20. Birzele B, Meier A, Hindorf H, Krämer J, Dehne HW. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. In *Mycotoxins in Plant Disease* Springer Netherlands 2002;667–673.
21. Bíro D, Juracek M, Kacaniova M, Simko M, Gálik B, Micháľková J, Gyongyova E. Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2009;16(2):227–232.
22. Bluhm BH, Cousin MA, Woloshuk CP. Multiplex real-time PCR detection of fumonisin-producing and trichothecene-producing groups of *Fusarium* species. *J Food Protect* 2004;67:536–543.
23. Borreani G, Tabacco E. Low permeability to oxygen of a new barrier film prevents outgrowth of butyric acid bacteria in farm corn silage. *J Dairy Sci* 2008;91:4272–4281.
24. Borreani G, Tabacco E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. *J Dairy Sci* 2010;93:2620–2629.
25. Boudergue C, Burel C, Dragacci S, Favrot MC, Fremy JM, Massimi C, Prigent P, Debongnie P, Pussemier L, Boudra H, Morgavi D, Oswald I, Perez A, Avantiaggiato G. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publication* 2009;6(9):192.
26. Boudra H, Morgavi DP. Reduction in *Fusarium* toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time. *Journal of agricultural and food chemistry* 2008;56(12):4523–4528.
27. Bruggen AHC, Termorshuizen AJ. Integrated approaches to root disease management in organic farming systems. *Australasian Plant Pathology* 2003;32:141–156.
28. Burt S. Essential oils: their antimicrobial properties and potential application in foods-A review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;94:223–253.
29. Bryden WL. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol* 2012;173:134–158.
30. Butkutė B, Gaurilčikaitė R. Lietuvos ūkiuose gaminamo kukurūzų siloso pašarinė vertė ir kokybę lemiantys veiksniai. *Veterinarija ir zootechnika* 2008;41(63).
31. Błajet-Kosicka A, Twarużek M, Kosicki R, Sibiorowska E, Grajewski J. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. *Food Control* 2014;38:61–66.
32. Calvert TW, Aidoo KE, Candlish AGG, Mohd Fuat AR. Comparison of in vitro cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines. *Mycopathologia* 2005;159:413–419.
33. Cavaglieri L, Orlando JRMI, Rodriguez MI, Chulze S, Etcheverry M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* (2005);156(5-6):748–754.

34. Cavallarin L, Tabacco E, Antoniazzi S, Borreani G. Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as a result of aerobic exposure. *J Sci Food Agric* 2011; 91:2419–2425
35. Celi P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2011;33(2):233-240.
36. Chandler EA, Simpson DR, Thomsett A, Nicholson P. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2003;62:355–367.
37. Charmley E, Trenholm HL, Thompson BK, Vudathala D, Nicholson JWG, Prelusky DB, Charmley LL. Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production and its composition. *J Dairy Sci* 1993;76:3580-3587.
38. Cheli F, Campagnoli A, Dell’Orto V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology* 2013;183:1–16.
39. Commission Recommendation (EU) 2016/1319, amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food
40. Commission Regulation (EC) No 386/2009, amending Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives .
41. Criseo G, Bagnara A, Bisignano G. Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33:291–295.
42. Demeke T, Clear RM, Patrick SK, Gaba D. Species specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Int J Food Microbiol* 2005;103:271–284.
43. Desjardins AE, Proctor RH. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int J Food Microbiol* 2007; 119:47–50.
44. Devegowda G, Murthy TNK. Mycotoxins: Their adverse effects in poultry and some practical solutions. In: *The Mycotoxin Blue Book* (Ed. D. E. Diaz). Nottingham University Press, Nottingham, UK 2005.p. 25-56.
45. Dimitrijević S. I., Mihajlovski K. R., Antonović D. G., Milanović–Stevanović M. R. and Mijin D. Z. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic–acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chemistry* 2007;104 (2):774– 782.
46. Dinesh D, Jayasena A. Essential oils as potential antimicrobial agents in meats and meat products: A review. *Food Science and Technology* 2013;34(2):96–108.
47. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed - Council statement. *Official Journal L* 140, 30/05/2002 P. 0010 – 0022.
48. Dogi CA, Fochesato A, Armando R, Pribull B, Souza MMS, da Silva Coelho I, Cavaglieri L. Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *Journal of applied microbiology* 2013;114(6):1650-1660.
49. Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 2003;109:755–768.

50. Driehuis F, Elferink SJWH, Spoelstra SF. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology* 1999;87(4):583-594.
51. Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, Te Giffel MC. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of dairy science* 2008; 91(11):4261-4271.
52. Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, Te Giffel MC. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands'. *Food Addit Contam. B* 2008;(1):41–50.
53. Druvefors UA, Schnürer J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Res* 2005;5:373–378.
54. Dunière L, Sindoub J, Chaucheyras-Durand F, Chevallier I, Thévenot-Sergentet D. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology* 2013;182:1–15.
55. Eastridge ML. Major advances in applied dairy cattle nutrition. *Journal of dairy science* 2006;89(4):1311-1323.
56. FEFAC. The Compound Feed Industry in the EU Livestock Economy 2015: Available online: <http://www.fefac.eu/files/62107.pdf> (Accessed 13 November 2015).
57. Elferink SJWHO; Driehuis F, Gottschal JC, Spoelstra SF. Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Plant Production and Protection Paper* 2000;161:17-30.
58. Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection* 2001;64:1019–1024.
59. European Commission. Facts and Figures on Organic Agriculture in the European Union 2013 Available at: http://ec.europa.eu/eurostat/agriculture/organic/eu-policy/data-statistics/index_en.htm
60. Fink-Gremmels J. Conclusions from the workshops on ochratoxin A in food: recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria) 2005; 29 (1).
61. Fink-Gremmels J, Malekinejad H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology* 2007;137(3):326-341.
62. Fink-Gremmels, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants* 2008;25(2):172-180.
63. Fulgueira CL, Amigot SL, Gaggiotti M, Romero LA, Basílico JC. Forage quality: Techniques for testing. *Fresh Prod* 2007;1(2):121-131.
64. Gad SC. *In vitro* toxicology, 2nd ed. Taylor & Francis, New York – London. 2000.
65. Gallo A, Giuberti G, Frisvad JC, Bertuzzi T, Nielsen KF. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins* 2015;7(8):3057-3111.
66. Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J, Demo M. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J* 2009;24:348–354.

67. Garon D, Richard E, Sage L, Bouchart V, Pottier D, Lebailly P. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *J Agric Food Chem* 2006;54:3479–3484.
68. Gąsior R, Brzońska F. The type and level of biogenic amines in alfalfa and red clover silage. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie*. 1999. Vol. 347. P. 89–94.
69. Gąsior R. Oznaczanie lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego w kiszonkach i treści zwacza. Instytut Zootechniki, Balice, Kraków 2002.
70. GMP. Certification Scheme Animal Feed Sector, 2006. Version Marzo 2008. Appendix 1: Product standards (including residue standards). The Hague, the Netherlands: Productschap Diervoeder 2008.p.1–39.
71. Gollop N, Zakin V, Weinberg ZG. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology* 2005;98:662–666.
72. Gutierrez J, Barry–Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media, efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology* 2009;26(2):142–150.
73. Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2002;11:309–320.
74. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. Extraction Technologies for medicinal and aromatic plants, international centre for science and high technology, Trieste. 2008. p. 22.
75. Hargreaves A, Hill J, Leaver JD. Effect of stage of growth on the chemical composition, nutritive value and ensilability of whole-crop barley. *Anim Feed Sci Technol* 2009;152:50–61.
76. Hashemi M, Gholampour Azizi I, Rezai Z, Rouhi S. . Mycological Survey and Total Aflatoxin Analyze in Silage from Qaemshahr City (Northern Iran). *Journal of Chemical Health Risks* 2012;2(2):51–56.
77. Hunt J, Boddy L, Randerson PF, Rogers H J. An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microbial Ecology* 2004; 47:385–395.
78. Jatkauskas J, Vrotniakienė V. Varpinių – ankštinių javų vegetacinės masės silosavimas ir naudojimas galvijų pašarui. Kaunas: Arx Baltica 2004.p.25.
79. Jatkauskas J, Vrotniakienė V. Konservuotų pašarų atsargos žiema. *Mano ūkis*. 2006;9.
80. Jatkauskas J; Vrotniakienė V. Evaluation of fermentation parameters, microbiological composition and aerobic stability of grass and whole crop maize silages treated with microbial inoculants. *Zemdirbyste-Agriculture* 2013;100(2):143–150.
81. Joosten HM, Olieman C. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by HPLC in combination with thermo-sensitized reaction. *J Chromatogr* 1986;356:311–319.
82. Jouany JP, Diaz DE. Effects of Mycotoxins in Ruminants *The Mycotoxin Blue Book* 2005.p.295–322.
83. Jouany JP. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 2007;137:342–362.
84. Juškienė V. Žemės ir maisto ūkio ir kaimo plėtros mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros 2007–2013 metų programa. „pašarų kokybės įvertinimas pieninių galvijų bandose, kuriuose vykdoma gyvulių produktyvumo kontrolė“

85. Kalač P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. *Food Chem* 2011;125:307-317.
86. Kiyothong K, Rowlinson P, Wanapat M, Khampa S. Effect of mycotoxin deactivator product supplementation on dairy cows. *Animal production science* 2012; 52(9):832-841.
87. Krnjaja V, Lević J, Stanković S, Petrović T, Tomić Z, Mandić V, Bijelić Z. Moulds and mycotoxins in stored maize grains. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2013; 29(3):527-536.
88. Křížek M., Kaláč P., Peterk, J. Biogenic amines in silage. 3. The occurrence of six biogenic amines in farm-scale grass and maize silages. *Archives of Animal Nutrition*. 1993;45:131-137.
89. Konosonoka IH, Jemeljanovs A, Osmane B, Ikaunieca D, Gulbe G. Incidence of *Listeria* spp. in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia. *ISRN Veterinary Science* 2012;5:2012.
90. Korosteleva SN, Smith TK, Boermanst HJ. Effects of Feedborne *Fusarium* Mycotoxins on the Performance, Metabolism, and Immunity of Dairy Cows. *American Dairy Science Association* 2007;90:3867-3873.
91. Kostulak-Zielińska M, Potkański A. Quality of baled grass-clover silage ensiling with chemical additives. Chemical composition. *Annals of Animal Science* 2001;1:153-165.
92. Koul O, Singh G, Singh R, Singh J. Mortality and reproductive performance of *Tribolium castaneum* exposed to anethole vapours at high temperature. *Biopestic. Int.* 2007;3:126-137.
93. Kozłowska M, Ścibisz I, Zaręba D, Ziarno M. Antioxidant properties and effect on lactic acid bacterial growth of spice extracts. *CyTA – Journal of Food* 2015;13(4):573-577.
94. Kučinskienė J, Miceikienė I. Genetikos laboratoriniai darbai. *Citogenetika*. Kaunas; 2002.p.19-32.
95. Lairon D. Nutritional quality and safety of organic food. In *Sustainable Agriculture Volume 2*. Springer Netherlands 2011.p. 99-110.
96. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 2001;91:453-462.
97. Lin YT, Labbe RG, Shetty K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in shand meat system by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70:5672-5678.
98. Lingaas F, Tveit B. Etiology of acetoneemia in Norwegian cattle. 2. Effect of butyric acid, valeric acid, and putrescine. *J Dairy Sci* 1992;75:2433-2439.
99. Lioi MB, Santoro A, Barbieri R, Salzano S, Ursini MV. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2004;557(1):19-27.
100. LSM, 2014. Lietuvos statistikos metraštis 2014. Priėjimas internete: web.stat.gov.lt
101. Lugauskas A, Paškevičius A, Repečkienė J. Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje Vilnius: Aldorija 2002. p.412.
102. Macana J., Turk R., Vukušić J., Kipčić D., Milković-Kraus S. Long-term follow-up of histamine levels in a stored fish meal sample. *Anim. Feed Sci Technol* 2006; 127:169-174.

103. Magan N, Aldred D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol* 2007;119:131–139.
104. Mankevičienė A, Butkutė B, Gaurilčikienė I, Dabkevičius Z, Supronienė S. Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control* 2011;22(6):970-976.
105. Mansfield MA, Kulda GA. Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia* 2007;99(2):269–278.
106. Melnikienė R. Lietuvos agrarinės ekonomikos institutas produktų rinkotyros skyrius. Lietuvos respublikos ilgalaikės gyvulininkystės plėtros strategijos iki 2020 metų koncepcija. 2011:1-61.
107. Meulenaer B. Chemical Hazards, In: P. A. Luning, F. Devlieghere and R. Verhé, Eds., *Safety in the Agri-Food Chain*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen 2008:145-208.
108. Mo M, Selmer-Olsen I, Randby ÅT, Aakre SE, Asmyhr A. New fermentation products in grass silage and their effects on feed intake and milk taste. *Proc. 10th Int. Symp. Forage Conservation*, Brno, Czech Republic 2001:98–99.
109. Morgavi DP, Riley RT. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* 2007;137:201-212.
110. Muck RE. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. *Transactions-american society of agricultural engineers* 2004;47(4):1011-1016.
111. Muck RE. Silage microbiology and its control through additives. *R Bras Zootec* 2010;39:183-191.
112. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement, Document M 100-S11. NCCLS 2001 –Wayne. PA.
113. Ndlovu CS, Dutton MF. A survey of South African silage for fungi and mycotoxins. *African Journal of Agricultural Research* 2013;8(32):4299-4307.
114. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(8):4458-67.
115. Nishino N, Hattori H, Wada H, Touno E. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology* 2007;103:325–332.
116. Nouri AB, Dhifi W, Bellili S. Chemical Composition, Antioxidant Potential, and Antibacterial Activity of Essential Oil Cones of Tunisian *Cupressus sempervirens*. *Journal of Chemistry* 2015;1-8.
117. O'Brien M, Nielsen KF, O'Kiely P. et al. *J. Agric. Food Chem* 2006;(54):9268-9276.
118. Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, Oude Elferink SJWH, Spoelstra SF. Microbiology of ensiling. In: Buxton DR, Muck RE, Harrison JH, editors. *Silage Science and Technology*. Madison: ASA, CSSA, SSSA 2003;42:31–93.
119. Pahlow G. Basics and principles of ensiling. *Übersichten zur Tierernährung* 2007;35(1):1-11.
120. Pereira P, Nesci A, Etcheverry M. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. *Biological control* 2007;42(3):281-287.
121. Pereyra ML, Gonza'lez Alonso VA, Sager R, Morlaco MB, Magnoli CE, Astoreca AL, Rosa CAR, Chiacchiera SM, Dalcero AM, Cavaglieri LR. Fungi and selected

- mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology* 2008;104:1034–1041.
122. Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxinivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol Lett* 2004; 153:61–73.
 123. Pfohl-Leskowicz A, Manderville RA. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research* 2007;51(1):61-99.
 124. Pinotti L, Ottoboni M, Giromini C, Dell’Orto V, Cheli F. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins (Basel)* 2016;8(2):45.
 125. Pinton P, Nougayrède JP, Del Rio JC, Moreno C, Marin DE, Ferrier L, Bracarense AP, Kolf-Clauw M, Oswald IP. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;237:41–48.
 126. Pinottim L; Ottoboni M; Dell’OrtoV, Cheli, F. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins* 2016;8(2):45.
 127. Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD. Biosynthetic and genetic relationships of B-series fumonisins produced by *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Nat. Toxins* 1999;7:251–258.
 128. Purwin C, Pysera B, Sederevičius A. Effect of silage made from different plant raw materials with the addition of a fermentation inhibitor on the production results of dairy cows. *Vet Zootec* 2010;51:44-51.
 129. Qi W, Hou LH, Guo HL, Wang CL, Fan ZC, Liu JF. Effect of salt-tolerant yeast of *Candida versatilis* and *Zygosaccharomyces rouxii* on the production of biogenic amines during soy sauce fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2014;94:1537–1542.
 130. Rasmussen RR, Rasmussen PH, Larsen TO, Bladt TT, Binderup ML. In vitro cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49:31–44.
 131. Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Jaimand K, Alinezhad S, Saberi R, Yoshinari T. Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* L. and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control* 2009;20(11):1018- 1024.
 132. Regulation (EC) No 183/2005 Of the European Parliament and of the Council of 12 January 2005 laying down requirements for feed hygiene.
 133. Reindl A, Dzieciol M, Hein I, Wagner M, Zangerl P. Enumeration of clostridia in goat milk using an optimized membrane filtration technique. *Journal of Dairy Science* 2014; 97(10):6036–6045.
 134. Richard E, Heutte N, Bouchart V, Garon D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology* 2009;148(2-4):309–320.
 135. Robens J, Cardwell K. The costs of mycotoxin management to the USA: management of aflatoxins in the United States. *J Toxicol – Toxin Rev* 2003;22: 139–152.
 136. Rohweder D, Valenta H, Sondermann S, Schollenberger M, Drochner W, Pahlow G, Dänicke S. Effect of different storage conditions on the mycotoxin contamination of *Fusarium culmorum*-infected and non-infected wheat straw. *Mycotoxin research* 2011;27(2):145-153.

137. Rossi F, Dellaglio F. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *Journal of Applied Microbiology* 2007;103:1707–1715.
138. Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. In-vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 2004;67:1252–1256.
139. Saguibo JD, Elegado FB. Resistance profile of probiotic lactic acid bacteria against inhibitory effects of selected plant extracts. *The Philippine Agricultural Scientist* 2012;95:22–32.
140. Samson R A, Hoekstra ES, Lund F, Filtenborg O, Frisvad JC. Methods for the detection, isolation and characterization of food-borne fungi. 2000.
141. Schnerr H, Vogel RF, Niessen L. Correlation between DNA of trichothecene producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentration in wheat-samples. *Letters in Applied Microbiology* 2002;35:121-125.
142. Seppälä A, Heikkilä T, Mäki M, Rinne M. Effects of additives on the fermentation and aerobic stability of grass silages and total mixed rations. *Grass Forage Sci* 2016;71:458–471.
143. Shapira RN, Paster O, Eyal M, Menasherov A, Mett RS. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR *Appl Environ Microbiol* 1996;62:3270–3273.
144. Sharifzadeh A, Momeni H, Ghasemi-Dehkordi P, Doosti A. Presence of *Listeria monocytogenes* in silage products of Shahrekord city. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2015;5:133-136.
145. Signorini ML, Gaggiotti M, Molineri A, Chiericatti CA, Zapata de Basílico ML, Basílico JC, Pisani M. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chem Toxicol* 2012;50(2): 250-257.
146. Skladanka J, Adam V, Dolezal P, Nedelnik J, Kizek R, Linduskova H, Nawrath A. How do grass species, season and ensiling influence mycotoxin content in forage ? *International journal of environmental research and public health* 2013;10(11):6084-6095.
147. Skulmowski J. Metody określania składu pasz i ich jakości. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. 1974
148. Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova M, Zeman L, Kizek R. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary toxicology* 2010;3(3):94-99.
149. Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN, Filho JMB. Antimicrobial effectiveness of spices: An approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2005;48:549–558.
150. Soykan-Önenç S, Koc F, Coşkuntuna L, Özdüven ML, Gümüş T. The Effect of Oregano and Cinnamon Essential Oils on Fermentation Quality and Aerobic Stability of Field Pea Silages. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 2015;28(9):1281.
151. Stadnik A, Borzęcki A. Influence of the zearalenone on the activity of chosen liver enzymes in rat. *Ann agric environ med* 2009;16:31-35.
152. Steidlová Š, Kalač P. Levels of biogenic amines in maize silages. *Animal Feed Science and Technology* (2002);102(1):197-205.
153. Storm IMLD, Kristensen NB, Raun BML, Smedsgaard J, Thrane U. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *J Appl Microbiol* 2010;109(3):1017-1026.

154. Storm IMLD, Rasmussen RR, Rasmussen PH. Occurrence of Pre- and Post-Harvest Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Danish Maize Silage. *Toxins (Basel)* 2014;6(8):2256–2269.
155. Sultana N, Hanif NQ. Mycotoxin contamination in cattle feed and feed ingredients. *Pakistan Vet. J* 2009;29(4):211-213.
156. Suproniene S, Justesen AF, Nicolaisen M, Mankeviciene A, Dabkevicius Z, Semaskiene R, Leistrumaite A. Distribution of trichothecene and zearalenone producing *Fusarium* species in grain of different cereal species and cultivars grown under organic farming conditions in Lithuania. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2010;17(1):79-86.
157. Šarkinas A. Augalų eterinių aliejų ir ekstraktų lakių junginių antimikrobinės savybės. *Maisto chemija ir technologija* 2008;42(2):104-109.
158. Tadpetch K, Kaewmee B, Chantakaew K, Kantee K, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S. Synthesis and cytotoxic activities of semisynthetic zearalenone analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016;26(15):3612-3616.
159. Tangni EK Kossi, Pussemier L, Van Hove F. Mycotoxin contaminating maize and grass silages for dairy cattle feeding: current state and challenges. *J Anim Sci Adv* 2013;3(10):492-511.
160. Tasci F, Turutoglu H, Ogutcu H. Investigations of *Listeria* species in milk and silage produced in Burdur province. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Kafkas* 16 (Suppl-A) 2010:93–97.
161. Tayel AA, Salem MF, El-Tras WF, Brimer L. Exploration of Islamic medicine plant extracts as powerful antifungals for the prevention of mycotoxigenic *Aspergilli* growth in organic silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2011;91(12):2160-2165.
162. Thylin I. Methods of preventing growth of *Clostridium tyrobutyricum* and yeasts in silage. In: *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae* 2000:223.
163. Trenholm HL, Thompson BK, Martin KE, Greenhalgh R, McAllister AJ. Ingestion of Vomitoxin (Deoxynivalenol)-Contaminated Wheat by Nonlactating Dairy Cows I. *Journal of Dairy Science* 1985;68(4):1000-1005.
164. Tripathi MK., Mondal D, Karim SA. Growth, haematology, blood constituents and immunological status of lambs fed graded levels of animal feed grade damaged wheat as substitute of maize. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2008.;92:75-85.
165. Tristezza M, Vetrano C, Blevé G, Spano G, Capozzi V, Logrieco A. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region. *Food Microbiology* 2013;36:335–342.
166. Tsitsigiannis ID, Dimakopoulou M, Antoniou PP, Tjamos CE. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea* 2012;5(1):158–174.
167. Upadhaya SD., Park MA., Ha JK. Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* 2010;23(9):1250–1260.
168. Van de Walle J, Sergeant T, Piront N, Toussaint O, Schneider Y-J, Larondelle Y. Deoxynivalenol affects *in vitro* intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis. *Toxicol Appl Pharm* 2010;245:291–298.
169. Van Os M, Dulphy JP, Baumont R, Jailler M, Ballet JM. The influence of ammonia and amines on grass silage intake and intake behaviour in dairy cows. In *Annales de Zootechnie* 1995;44(1):73-85.

170. Vandersickel V, Slabbert J, Thierens H, Vral A. Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. *Radiation Measurements* 2011;46(1):72–75.
171. Vilar MJ, Yus E, Sanjuán ML, Diéguez FJ, Rodríguez-Otero JL. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *Journal of dairy science* 2007;90(11):5083–5088.
172. Vissers MMM, Driehuis F, Te Giffel MC, De Jong P, Lankveld JM.G. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science* 2007;90:928–936.
173. Völkel I, Schröer-Merker E, Czerny CP. The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. *Food Nutr Sci* 2011;2:852–867.
174. Wambacq E, Vanhoutte I, Audenaert K, De Gelder L, Haesaert G. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. *J Sci Food Agric* 2016;96:2284–2302.
175. Wan LQ, Li X, Zhang XP, He F. Effect of adding lactic acid bacteria and glucose on alfalfa silage quality *Chinese Journal of Eco-Agriculture* 2007;3:032.
176. Whitlow LW; Hagler JR; Diaz DE. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* 2010;15:74–84.
177. Wilkinson JM, Toivonen MI World silage: a survey of forage conservation around the world. Chalcombe Publ 2003.
178. Wilkinson JM, Davies DR. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass Forage Sci* 2013;68:1–19.
179. Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 2011;15(2): 129–144.
180. Žemės ūkio, maisto ūkio ir žuvininkystės mokslinių tyrimų ir taikomosios veiklos projektas. 2015. Available at: https://zum.lrv.lt/uploads/zum/documents/files/LT_versija/Veiklos_sritys/Mokslas_mokymas_irkonsultavimas/Moksliniu_tyrimu_ir_taikomosios_veiklos_darbu_galutines_ataskaitos/LSMU%20GI%20holsteinai.pdf

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

Leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje Clarivate Analytics Web of Science ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Matusevičius, Paulius; Lipiński, Krzysztof; Antoszkiewicz, Zofia; Fijałkowska, Maja. Biogenic amines and mycotoxins concentrations in baled silage from organic and conventional farms = Concentrações de aminos biogênicas e micotoxinas em silagem embalada de fazendas orgânicas e convencionais / J. Jovaišienė, B. Bakutis, V. Baliukonienė, P. Matusevičius, K. Lipiński, Z. Antoszkiewicz, M. Fijałkowska // Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia. Minas Gerais: Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia. ISSN 0102-0935. 2017, vol. 69, no. 2, p. 269-287.
2. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Gerulis, Gediminas. Fusarium and Aspergillus mycotoxins effects on dairy cow health, performance and the efficacy of anti-mycotoxin additive / J. Jovaišienė, B. Bakutis, V. Baliukonienė, G. Gerulis // Polish journal of veterinary sciences. Berlin: De Gruyter. (Original article). ISSN 1505-1773. 2016, vol. 19, no. 1, p. 79–87.

Kituose leidiniuose, referuojamuose Clarivate Analytics Web of Science:

1. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Kačergius, Audrius; Paškevičius, Algimantas; Gerulis, Gediminas. Hygienic sanitary estimation of maize silage in dairy farms in Lithuania / Jurgita Jovaišienė, Bronius Bakutis, Violeta Baliukonienė, Audrius Kačergius, Algimantas Paškevičius, Gediminas Gerulis // The 7th international scientific conference RURAL DEVELOPMENT 2015: Towards the Transfer of Knowledge, Innovations and Social Progress : 19-20th November, 2015 / Aleksandras Stulginskis University / Edited by prof. Asta Raupelienė. Akademija (Kauno raj.): LŽŪU Leidybos centras. ISSN 1822-3230. 2015, vol. 00 book 00, p. 1-5.

Recenzuojamuose mokslo leidiniuose, referuojamuose kitose duomenų bazėse:

1. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Matusevičius, Paulius; Lipiński, Krzysztof; Antoszkiewicz, Zofia; Fijałkowska Maja. Mycotoxins and biogenic amines content and their changes during storages in produced in Lithuania in maize silages / Veterinarija ir zootechnika. 2016, t. 73(95), suppl. 2016. ISSN 1392-2130 p. 58-63.

Kitos publikacijos, seminarai, konferencijos disertacijos tema:

1. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Gerulis, Gediminas; Židonytė, Gabrielė; Falkauskas, Rimvydas. Cytotoxic effect of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol on different cells / Jurgita Jovaišienė, Bronius Bakutis, Violeta Baliukonienė, Gediminas Gerulis, Gabrielė Židonytė, Rimvydas Falkauskas // 39th Mycotoxin Workshop 2017 : Bydgoszcz, Poland 19th-21st June 2017
2. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Gerulis, Gediminas; Židonytė, Gabrielė; Falkauskas, Rimvydas. Fusarium-toxins occurrence in roughages / Jurgita Jovaišienė, Bronius Bakutis, Violeta Baliukonienė, Gediminas Gerulis, Gabrielė Židonytė, Rimvydas Falkauskas // 39th Mycotoxin Workshop 2017: Bydgoszcz, Poland 19th–21st June 2017
3. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Matusevičius, Paulius; Falkauskas, Rimvydas; Lipiński, Krzysztof; Antoszkiewicz, Zofia; Fijałkowska, Maja. Mycotoxins occurrence in Lithuanian's preserved feed / J. Jovaišienė, B. Bakutis, V. Baliukonienė, P. Matusevičius, R. Falkauskas, K. Lipiński, Z. Antoszkiewicz, M. Fijałkowska // Tagungsband: 16. BOKU-Symposium Tierernährung "Der gesunde Verdauungstrakt" : 27. April 2017, Wien
4. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Matusevičius, Paulius; Lipiński, Krzysztof; Antoszkiewicz, Zofia; Fijałkowska, Maja. Mycotoxins and biogenic amines content and their changes during storages in produced in Lithuania in maize silages / Jurgita Jovaišienė, Bronius Bakutis, Violeta Baliukonienė, Paulius Matusevičius, Krzysztof Lipiński, Zofia Antoszkiewicz, Maja Fijałkowska // Tarptautinė mokslinė konferencija „Vietinių pašarinių žaliavų panaudojimas gyvūnų mitybai: nauda ir apribojimai, susiję su virškinimo fiziologija bei jų įtaka produkcijos kokybei ir gyvūnų sveikatai“: 2016 m. spalio 6 d. Kaunas = International scientific conference "
5. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Kačergius, Audrius; Paškevičius, Algimantas; Gerulis, Gediminas. Hygienic sani-

- tary estimation of maize silage in dairy farms in Lithuania / Jurgita Jovaišienė, Bronius Bakutis, Violeta Baliukonienė, Audrius Kačergius, Algimantas Paškevičius, Gediminas Gerulis // The 7th international scientific conference RURAL DEVELOPMENT 2015: Towards the Transfer of Knowledge, Innovations and Social Progress: 19-20th November, 2015 / Aleksandras Stulginskis University. Kaunas: Aleksandras Stulginskis University, 2015.
6. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Skredėnaitė, Lina. Prevalence of aflatoxin M₁ in raw milk in Lithuania / Jurgita Jovaišienė, Bronius Bakutis, Violeta Baliukonienė, Lina Skredėnaitė // IDF Pasaulinis pienininkystės kongresas "Tvarios pienininkystės svarba tenkinant mitybos poreikius" : Vilnius, Lietuva, 2015 m. rugsėjo 20–24 d. = IDF World Dairy Summit "Closing the Nutritional Gap with Sustainable Dairy" : Vilnius, Lithuania, September 20–24, 2015.
 7. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta; Kačergius, Audrius; Gerulis, Gediminas. Contamination of fresh and ensiled maize silage by mycotoxins and mycotoxigenic fungi / Jurgita Jovaišienė, Bronius Bakutis, Violeta Baliukonienė, Audrius Kačergius, Gediminas Gerulis // 35th Mycotoxin Workshop: May 22–24, 2013 Ghent, Belgium : conference abstracts / Ghent University Association. Society for Mycotoxin Research. Ghent: Ghent University Association, 2013. (Production and occurrence.). p. 143-143, no. P65.
 8. Jovaišienė, Jurgita; Bakutis, Bronius; Baliukonienė, Violeta. Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and aflatoxin M₁ in milk / Jurgita Jovaišienė, Bronius Bakutis, Violeta Baliukonienė // Žemės ūkio gyvulių fiziologija: Tarptautinė mokslinė konferencija, skirta LSMU Veterinarijos akademijos Anatomijos ir fiziologijos katedros Virškinimo fiziologijos ir patologijos mokslinio centro 20 metų jubiliejui paminėti: Programa ir tezės: Kaunas, 2012 rugsėjo 27–28 d. = Physiology of livestock: International scientific conference.

DOI 10.1515/pjvs-2016-0011

Original article

***Fusarium* and *Aspergillus* mycotoxins effects on dairy cow health, performance and the efficacy of Anti-Mycotoxin Additive**

J. Jovaišienė, B. Bakutis, V. Baliukonienė, G. Gerulis

Department of Food Safety and Quality, Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences, Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania

Abstract

One hundred two samples of feeds made in Lithuania, which included maize silage, grass-legume silage, hay and ensiled crimped maize were investigated during 2008-2012 for contamination with some mycotoxins. The highest concentrations of mycotoxins determined were those of deoxynivalenol (DON) – 471.0 µg/kg and aflatoxin B₁ (AFB₁) – 21.2 µg/kg in ryegrass silage from bales, and zearalenone (ZEA) – 625.0 µg/kg in maize silage from trenches. The present study has been carried out based on these data because animal feeds contaminated with mycotoxins can cause reduced productivity of dairy cows and health disorders in the long term. The aim of this study was to investigate the long-term exposure of toxic effects of a diet naturally contaminated with low concentrations of mycotoxins on milk composition and biochemical, hematological, immunological parameters of dairy cows and to determine the anti-mycotoxin effect of Mycofix Plus 3.E. Twenty eight clinically healthy, medium productive Lithuanian Red cows were selected. ZEA was a major contaminant found in the corn silage at concentration levels of up to 1000.0 µg/kg of dry matter. DON was the second major found in the hay at concentration levels of up to 600.0 µg/kg of dry matter. The highest concentration AFB₁– 10.0 µg/kg was determined in ground barley. The Anti-Mycotoxin Additive (AMA) Mycofix Plus 3.E was given individually to 14 cows at a concentration of 40.0 g daily for 9 weeks.

The present results indicate that feeds naturally contaminated with low concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. in a diet of dairy cows can have a negative influence on somatic cell count, blood parameters and immunity. The addition of an Anti-Mycotoxin Additive (Mycofix Plus 3.E) to diet of dairy cows can prevent many of these effects.

Key words: Anti-Mycotoxin Additive, mycotoxins, dairy cows, blood parameters, milk composition

Correspondence to: J. Jovaišienė, e-mail: jurgita.jovaisiene@ismuni.lt, tel.: +370 36 32 08

Brought to you by | Lithuanian Univ. Health Sciences
Authenticated
Download Date | 5/3/17 1:37 PM

Introduction

Molds are filamentous (fuzzy or dusty looking) fungi that occur in many feedstuffs including roughages and concentrates. Molds can infect dairy cattle, especially during stressful periods when they are immune suppressed, causing a disease referred to as a mycosis. Molds also produce poisons called mycotoxins that affect animals when they consume mycotoxin contaminated feeds. This disorder is called a mycotoxicosis (Whitlow 2005). It is generally accepted that the *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* molds are among the most important in producing mycotoxins detrimental to cattle. The mycotoxins of the greatest concern include: aflatoxins, which are generally produced by *Aspergillus* mold; deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin, fumonisins, which are produced by *Fusarium* molds; ochratoxins produced by *Penicillium* molds. There are hundreds of different mycotoxins which are diverse in their chemistry and have effects on animals. It is likely that contaminated feeds will contain more than one mycotoxin (Whitlow and Hagler 2002). In order to protect animal health some countries have recommendations for deoxynivalenol, ochratoxin A, fumonisins and zearalenone content in feed (European Commission 2006, Rasmussen et al. 2011).

Little is known about the effects of feedborne *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* mycotoxins and their synergisms on the performance, hematological and biochemical blood parameters, and milk composition of dairy cattle. The data concerning the effects of mycotoxin-contaminated diets on health and performance of dairy cows are still rare. Studies by Danicke et al. (2005), and Seeling et al. (2006) showed that DON concentrations ranging between 3.1 and 3.5 mg g⁻¹ feed (88% DM) did not cause any significant adverse health effects but transiently increased post-prandial ammonia concentrations (Fink Grammels 2008). Fink Grammels (2008) found correlation between the capacity of the rumen to inactivate mycotoxins and the likelihood of adverse health effects in cattle. A chronic exposure to low levels of mycotoxins typically gives non-specific symptoms such as an impaired immune system and increased infections or metabolic and hormonal imbalances (Morgavi and Riley 2007, Fink-Gremmels 2008, Rasmussen et al. 2011).

Nature has provided ruminants with a distinct ability to detoxify and degrade mycotoxins present in feed in the form of ruminal microflora and microfauna; however, this ability is saturable (Khatoon 2012). The effect of mycotoxins on the performance, metabolism, and immunity in dairy cattle was demonstrated elsewhere. Those adverse effects on health are unexpected and commonly associated with dose de-

pendence and a long exposure. High-yielding cattle, especially during a transition period, are prone to be more sensitive to mycotoxins than fattening cattle (Chaiyotwittayakun 2010). Different factors like metabolic disorders (rumen acidosis, milk fever, etc.), abrupt change in diet, a high protein diet, negative energy balance, antimicrobial activity of some mycotoxins, etc. can decrease the detoxifying ability of ruminal microflora (Khatoon 2012).

An alternative approach to reducing the exposure to mycotoxins in feed is decreasing the bioavailability by the inclusion of mycotoxin detoxifying agents (mycotoxin detoxifiers) in the feed. This method is most commonly used today (Devreese et al. 2013). A frequently used method for controlling mycotoxicosis is the use of material nutritionally inherent to the animals' diet, in order to decrease the absorption of mycotoxins in the gastrointestinal tract. These substances were called mycotoxin adsorbent and are now generically called Anti-Mycotoxin Additives (AMA) (Mallmann et al. 2009). Favourable results have been observed when adsorbent materials such as clays (bentonites), complex indigestible carbohydrates such as glucomannans or mannanoligosaccharides and other similar products are added to mycotoxin contaminated diets of rats, poultry, swine and cattle (Whitlow 2005).

The aims of this study were to investigate the long-term exposure of toxic effects of diet naturally contaminated with low concentrations of mycotoxins on biochemical, hematological, immunological parameters and milk composition of dairy cows and to determine the effect of Mycofix Plus 3.E.

Materials and Methods

Experimental animals and diets

A total of 28 Lithuanian Red dairy cows of different parities (approximately 25% primiparous and 75% of multiparous, randomly assigned in groups) were used in the experiment (14 cows per trial). The cows were in third lactation, the duration of the lactation was 122 ± 15.9 days. The milk-yield of cows was 15.36 kg/d., an average of milk fat was 4.14 ± 0.25%, protein content 3.06 ± 0.04% and urea – 23.80 ± 1.35 mg %. The diets were fed for 63 days and included two groups. The first group was control (CG) – a naturally contaminated diet. The second group was experimental (EG) – a naturally contaminated diet + 40 g per day for cow Mycofix® Plus 3.E (mineral components, biological constituent, live organism, phytogetic substances, phycothetic constituents). Barley, silage, haylage and hay were the sources of

Table 1. Diets composition.

Ingredients	Naturally contaminated (TMR)		Naturally contaminated TMR + Mycofix® Plus 3.E	
	As fed, kg/cow per day	DM, kg/cow per day	As fed, kg/cow per day	DM, kg/cow per day
Silage (oats, feeding pease, lucerne) (31.0% of DM)	35.0	10.85	35.0	10.85
Haylage (lucerne and cocksfoot) (35.12% of DM)	35.0	12.29	35.0	12.29
Hay (perennials, different botanical composition grasses) (93.1% of DM)	5.0	4.66	5.0	4.66
Ground barley (90.0% of DM)	18.0	16.20	18.0	16.20
Mycofix® Plus 3.E	–	–	0.04	0.04
Total TMR	93.0	44.00	93.0	4.04

Table 2. Effect of diets on health and performance of dairy cows.

Cows group	Temperature °C	Puls rate (per minute)	Respiratory rate (breaths/minute)	Rumen contraction rate (per 2 minutes)
CG				
Mean±SE	38.48±0.005	67.04±0.32	19.05±0.19	3.99±0.04
EG				
Mean±SE	38.45±0.007	69.2±0.22	20.20±0.17	4.01±0.05
Reference values (Sutkevičius, 2003)	37.50 – 39.00	50.00 – 80.00	10.00 – 30.00	2.00 – 5.00

CG – control group; EG- experimental group

feedborne mycotoxins, the experimental diets were prepared locally and formulated according to energy requirements for dairy cows. The total mixed ration (TMR) is documented in Table 1.

Chemical composition (crude proteins, lipids, soluble sugars and starch, NDF, ADF, ash) of silage, haylage and hay, ground barley samples after drying, were determined by laboratory analysis with NIRS. Metabolizable energy (ME), net energy for lactation (NEL) and fermentation were calculated according to VDLUFA (Germany) methodology. Amounts of dry matter (DM) in feeds were individually recorded at once before the trial. The samples were oven-dried at 105°C for 48 h and the percentage of DM calculated.

Animals health

During the trial period the cows were housed in group pens according to their feeding group, with individual feeders. The feed and water were provided *ad libitum*. The cows were milked twice a day in their stalls without daily exercise.

The experiment proceeded without any noticeable incidents. The health status of the cows was regularly

checked by a veterinarian, as documented in Table 2. Acute mastitis occurred during the trial just sporadically, once in the control and once in the experimental groups as it was treated, this disease should not be over-interpreted in the present experiment.

Analysis of feedborne mycotoxins

Dietary contents of AFB₁, ZEA were analyzed by Thin-layer chromatography (TCL) and described by Romer Labs Inc. *Method (Code: a/z-tl-01-00.2) and deoxynivalenol (DON) (Code: CAM-000031-1). All samples of feeds were dried at 70°C for 24 h in an oven, ground to pass a 1 mm screen. Twenty five grams of each sample was extracted with 100 ml acetonitrile/DI water (84/16, v/v) solution for 3 min into a blender. The extract was filtered through Whatman N° 4 filter paper (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA).

Analysis of AFB₁, ZEA concentrations: 90 µL of glacial acetic acid was added to 9 mL of the filtrate and mixed well. Clean-up columns MycoSep® 226AflaZon+ Multifunctional columns (Romer Labs, Inc. Union, MO, USA) were used for cleaning the

extracts, following the methodology supplied by the manufacturer. Two mL of the extract were evaporated using the Romer Evap™ System. The residue was dissolved in 300 µL toluene/acetonitrile (97/3, v/v). 90 µL of sample and standards (10, 20, 40, 80 µL – AFB₁ spotting standard: 0.05 µg/mL and 15, 30, 60 µL of 5 µg/mL ZEA working standard) were spotted onto the TLC Silica gel 60 F254 plate with the AutoSpotter™ (Romer Labs TLC, AutoSpotter, Model 10). The matrix was prepared by adding 48 µL of AFB₁ spiking standard (0.625 µg/mL each of AFB₁) and 90 µL of 25 µg/mL ZEA spiking standard to 9 mL of 84/16 acetonitrile/water. Plate was developed of AFB₁ and ZEA in 9/1 (v/v) chloroform/acetone. The plate was viewed under a long wave of UV light. ZEA appeared light green with an R_f (retention factor) of approximately 0.9, AFB₁ appeared blue and has an R_f of approximately 0.45. The plate was spread with 15% aluminum chloride in methanol. The plate was viewed again under UV light. ZEA appeared blue. The plate was spread with 10% sulfuric acid in methanol. The plate was viewed again under UV light. AFB₁ appeared yellow.

Analysis of DON concentration: 10 ml of extract was transferred into a tube, pushed slightly over 4 mL through a MycoSep® 225 Trich column (Romer Labs, Inc. Union, MO, USA). Four mL of purified extract was transferred to the preconditioned MultiSep® 216 column (Romer Labs, Inc. Union, MO, USA) and collected. The extract has drained through MultiSep® 216 Trich column rinse with 12 mL of 84/16 acetonitrile/DI water and was collected. Evaporated with the Romer Evap™ System. 100, 200, 300, 400 ng of the TLC spotting standard was spotted on a TLC plate. The residue was dissolved in 400 µL of 2/1 acetone/methanol. Eighty µL of sample and matrix spike along with standards were spotted on silica gel TLC plate. The plate was developed with 1/2 toluene/acetone. The plate was sprayed with 15% aluminum chloride in methanol. The plate was heated at 150°C until standard spots were fully visible under a long wave of UV light. DON appears blue with R_f values of approximately 0.5.

The detection limit was 0.1 mg (ppm) of DON; 200 µg (ppb) of ZEA; 1.7 µg (ppb) of AFB₁.

Milk composition and amount

Representative samples of milk were taken once a month at the morning milking. The samples were researched in the State enterprise „Pieno Tyrimai“. The milk samples were analyzed for fat, protein, lactose, urea, Somatic Cell Count (SCC) „LactoScope FTIR“ (FT1.0. 2001; Delta Instruments, Netherlands).

Blood biochemistry

Blood samples were collected twice during the trial period: 0 day and 63 days (d.) from the *jugular vein* before the morning feeding. Blood samples were collected into a tube without any anticoagulant, allowed to clot and after centrifugation serum was produced. The serum was used to test the concentration of phosphorus, magnesium, total protein, albumin, urea, creatinine, glucose, alkaline phosphatase, glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, creatine kinase, alanine aminotransferase and laktat dehydrogenase. The following samples were determined in National Food and Veterinary Risk Assessment Institute's Department of Radiological Research Laboratory (Lithuania), using an automatic biochemical analyzer „Cobas Integra 400 plus“ (Tegiment Ltd, Roche, Switzerland).

Complete blood count

Blood samples for complete blood count analyses and leukograma were collected twice during a trial period: 0 d. and 63 d. from the *jugular vein* before the morning feeding in EDTA-coated blood tubes. Complete blood count for white blood cells, red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, red cell distribution width, platelets, mean packed volume, were determined in the Laboratory of Large Animal Clinic of VA LUHS by the automated differentiation analyzer „Abacus junior vet“. The total leukocyte and the differential leukocyte count were performed with May-Grunwald Giemsa. The percentage of leukocytes was established from the 100 cells count.

Serum Immunoglobulin (IgA) concentrations

Concentrations of IgA were determined in serum samples using the Bovine IgA test kit (GenWay Biotech, Inc), which is a highly sensitive two-site enzyme linked immunoassay (ELISA) for measuring IgA in bovine biological samples. The absorbance was measured at a wavelength of 450 nm on an ELISA reader spectrophotometer.

Statistical analyses were carried out using SPSS software (version 12.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values are presented as means ± standard error (SE) and were considered statistically significant when $p < 0.01$ and $p < 0.05$.

Table 3. Mycotoxin concentrations in feeds during the trial period.

Feedstuffs	Mycotoxins		
	AFB ₁ (µg/kg)	DON (µg/kg)	ZEA (µg/kg)
1. Silage (oats, feeding pease, lucerne), hay	6.0	350.0	550.0
2. Haylage (lucerne and cocksfoot)	7.0	500.0	700.0
3. Hay (perennials, different botanical composition grasses)	4.0	600.0	1000.0
4. Ground barley	10.0	450.0	270.0

Table 4. Effects of cows diets on milk production, milk composition and somatic cell count.

Parameters	Days	Groups			
		CG Mean ± SE	Effects of diet***	EG Mean ± SE	Effects of diet***
Milk production (kg/cow)	0	15.01 ± 0.98	0.28	14.14 ± 1.77	-0.9
	63	15.99 ± 1.71		16.06 ± 1.04	
Milk fat (%)	0	4.81 ± 0.3	0.48	4.25 ± 0.59	0.72**
	63	4.17 ± 0.40		3.53 ± 0.15	
Milk proteins (%)	0	3.48 ± 0.11	-0.18	2.84 ± 0.33	0.58*
	63	3.32 ± 0.32		3.44 ± 0.08	
Milk lactose (%)	0	4.61 ± 0.03	0.01	3.82 ± 0.44	0.41
	63	4.47 ± 0.44		4.48 ± 0.03	
Milk urea (%)	0	46.00 ± 2.25	0.11	33.07 ± 4.86	-0.14
	63	22.00 ± 0.43		23.36 ± 1.45	
SCC cells/ml x 1.000	0	47.5 ± 33.39	0.8**	40.9 ± 4.48	0.16
	63	82.5 ± 66.08		41.07 ± 4.49	

CG – control group; EG – experimental group.

* p<0.05; ** p<0.01; *** r value.

Results

Four feeds in the experimental diets were naturally contaminated with mycotoxins: silage, haylage, hay, barley. The hay contained ZEA as the major contaminant, DON and AFB₁ as minor contaminants. ZEA was the major contaminant found in the hay at levels of up to 1000.0 µg/kg of dry matter. DON was another contaminant found in the hay at levels of up to 600.0 µg/kg of dry matter. The highest AFB₁ concentration, 10.0 µg/kg, was found in ground barley. The analyzed concentrations of feedborne mycotoxins in the diets are given in Table 3.

Milk production and milk composition are presented in Table 4. Milk production (kg/cow) increased 12.0% (p>0.05) in experimental group and 6.1% (p>0.05) in the control group after 63 days. Somatic cells count was not significantly increased after 63 d. in the control group.

The results of the blood hematological analyses are presented in Table 5. Most of these parameters were not affected by diets with mycotoxins (AFB₁, DON, ZEA) and mycotoxins plus Mycofix Plus 3.E. The results of blood count monitored at the beginning

and at the end of the research show that there was no deviation from physiological values.

Serum biochemistry profiles for both cows groups are presented in Table 6. According to the data, urea parameter in the control group during the research period was higher than physiological values. Other biochemical parameters in both groups during the research were within the range of physiological values.

The immunity status of dairy cows was influenced due to low mycotoxins concentrations in diet. IgA concentrations were decreased not significantly after 63 d. in the control group and increased in the experimental group.

Discussion

In dairy cattle, up to 70% of the diet is composed of concentrates to meet the energy requirements of animals, resulting in possible exposure to more than one type of mycotoxins (Fink-Gremmels 2008). Mycotoxins can also be present in hay, straw and silage after a prolonged period of storage (Mansfield and Kuldau 2007). A high dry matter concentration

Table 5. Effects of cows diets on hematological values.

Parameters	Days	Groups				Reference values
		CG Mean ± SE	Effects of diet***	EG Mean ± SE	Effects of diet***	
White blood cells, 10 ⁹ /L	0	7.12 ± 0.52	0.38	10.36 ± 0.96	-0.68	4.0-12
	63	8.76 ± 0.71		10.77 ± 0.62		
GRA, 10 ⁹ /L	0	2.44 ± 0.19	0.18	4.42 ± 0.71	-0.19	0.6-6.7
	63	3.78 ± 0.40		4.11 ± 0.38		
Lymphocytes, %	0	4.17 ± 0.11	0.56*	5.05 ± 0.42	0.43	2.5-7.5
	63	4.19 ± 0.33		5.74 ± 0.37		
Platelets, 10 ⁹ /L	0	56.64 ± 45.06*	0.31	240.07 ± 35.69*	0.22	100-800
	63	183.00 ± 26.37		386.79 ± 168.39		
Red blood cells, 10 ¹² /L	0	5.56 ± 0.15	0.68**	6.09 ± 0.22	0.5	5.0-10.0
	63	5.96 ± 0.26		6.63 ± 0.25		
Haematocrit, %	0	26.81 ± 0.58	0.22	27.78 ± 0.66	0.27	24-46
	63	27.63 ± 0.75		30.30 ± 1.09		
Haemoglobin, g/L	0	77.64 ± 1.95	0.27	81.14 ± 2.23	0.51	80-150
	63	79.79 ± 2.70		85.72 ± 2.44		
Basophilic granulocytes (BG), %	0	3.00 ± 0.93	0.26	1.36 ± 0.31	-0.13	
	63	1.92 ± 0.50		1.50 ± 0.20		
Eosinophilic granulocytes (EG), %	0	13.43 ± 2.30	0.63*	11.71 ± 2.36	0.27	
	63	10.86 ± 1.79		12.64 ± 2.74		
Band Neutrophils, %	0	4.14 ± 0.66	0.24	4.93 ± 0.75	-0.1	
	63	7.79 ± 0.97		6.21 ± 0.97		
Segmented Neutrophils, %	0	22.57 ± 2.57	0.19	26.57 ± 3.31	0.14	
	63	30.21 ± 2.63		28.57 ± 3.29		
Monocytes, %	0	2.57 ± 0.68	0.5	1.86 ± 0.29	0.36	
	63	1.64 ± 0.32*		1.71 ± 0.34*		

CG – control group; EG – experimental group.

* p<0.05; ** p<0.01; *** r value.

(>50%) in the raw material makes silage more susceptible to self-heating and infestations with toxin-producing fungi (Purwin et al. 2006). According to the results of Marczuk et al. (2012) study, in the animals exposed to natural low-dose ZEA and DON mycotoxins was observed an acute autoimmune response and immunosuppression, as indirectly confirmed by blood morphological and biochemical tests. In the present study, levels of these mycotoxins were analyzed because they are in the range of the levels commonly found in the feed of dairy cows in Lithuania.

In a field study, diets with about 750.0 ppb ZEA and 500.0 ppb DON resulted in poor consumption, depressed milk production, diarrhea, increase in reproductive tract infections, and total reproductive failure (Whitlow 2005). In the present study, the concentration of milk proteins was significantly higher 17.44% (p<0.05) in the experimental group of cows, 63 d. after the beginning of the research. In the control group, this parameter was 4.6% (p>0.05) lower. The concentration of milk fat was significantly 16.94%

(p<0.01) lower in the experimental group while in the control group this parameter was not significantly 13.31% (p>0.05) lower, 63 d. after the beginning of the research. The count of somatic cells in the control group was significantly 42.42% (p<0.01) higher, while in the experimental group this parameter was not significantly 0.4% (p>0.05) higher, 63 d. after the beginning of the research. For example, the results from a Canadian study using 18 first-lactation cows during mid-lactation showed that cows consuming DON-contaminated diets (4 to 5 ppm) produced 13% less fat corrected milk (p<0.16) than the cows consuming clean feed (Whitlow 2005).

Literature data point out that lower ZEA levels influence hematological parameters in animals. Gajecka et al. (2004) have established significant ZEA influence on hematological results with regard to the number of erythrocytes and leucocytes, hemoglobin concentration, values of haematocrit and mean cell haemoglobin concentration, and the share of segmented neutrophilic granulocytes and lymphocytes. Fernandez et al. (2000) observed no effects of

Table 6. Effect of cows diets on serum chemical values and IgA levels.

Parameters	Days	Groups				Reference values
		CG Mean $\pm$ SE	Effects of diet***	EG Mean $\pm$ SE	Effects of diet***	
Total protein, g/L	0	70.96 $\pm$ 0.84	0.70	71.35 $\pm$ 1.21	0.34	70-94
	63	77.22 $\pm$ 1.12		76.00 $\pm$ 1.35		
Albumin, g/L	0	36.54 $\pm$ 0.47	0.25	34.54 $\pm$ 0.82	0.64*	34-43
	63	39.12 $\pm$ 0.86		37.98 $\pm$ 0.72		
Lactate dehydrogenase, U/L	0	1114.79 $\pm$ 63.47	0.77**	1410.36 $\pm$ 93.98	0.64*	308.6-938.1
	63	1270.93 $\pm$ 67.40		1564.38 $\pm$ 48.66		
Aspartate transaminase (AST), IU/L	0	80.27 $\pm$ 4.97	0.74**	85.44 $\pm$ 4.74	0.70**	56.0-176.0
	63	79.30 $\pm$ 4.85		102.74 $\pm$ 4.76		
Alanine transaminase, U/L	0	24.87 $\pm$ 0.65	0.49	22.51 $\pm$ 1.14	0.75**	6.9-35.3
	63	28.15 $\pm$ 1.14		27.50 $\pm$ 1.09		
Alkaline phosphatase (ALP), U/L	0	45.00 $\pm$ 4.11	0.70**	62.88 $\pm$ 11.94	0.86**	–
	63	50.19 $\pm$ 8.03		59.56 $\pm$ 10.61		
Gamma-glutamyl transferase (GGT), U/L	0	24.41 $\pm$ 1.49	0.58*	28.44 $\pm$ 1.49	0.6*	–
	63	29.04 $\pm$ 1.49		28.94 $\pm$ 2.28		
Glucose, U/L	0	1.73 $\pm$ 0.12	-0.16	1.60 $\pm$ 0.19	0.48	2.1-3.8
	63	1.87 $\pm$ 0.10		1.46 $\pm$ 0.16		
Ca, mmol/L	0	2.48 $\pm$ 0.03	0.14	2.30 $\pm$ 0.05	0.41	2.10-2.7
	63	2.69 $\pm$ 0.05		2.75 $\pm$ 0.03		
P-inorgani, mmol/L	0	2.06 $\pm$ 0.14	0.36	1.72 $\pm$ 0.16	0.39	1.46-2.83
	63	2.13 $\pm$ 0.09		2.19 $\pm$ 0.11		
Mg, mmol/L	0	0.90 $\pm$ 0.03	0.05	1.03 $\pm$ 0.04	0.28	0.85-1.2
	63	1.08 $\pm$ 0.03		1.07 $\pm$ 0.01		
Urea, mmol/L	0	5.03 $\pm$ 0.25	-0.22	4.19 $\pm$ 0.32	0.55*	3.0-8.3
	63	11.71 $\pm$ 6.23		6.19 $\pm$ 0.30		
Creatinine, mmol/L	0	69.07 $\pm$ 2.67	0.54*	63.14 $\pm$ 3.08	0.59*	40.0-80.0
	63	85.79 $\pm$ 3.59		85.50 $\pm$ 2.91		
Ig A, ng/mL	0	184.21 $\pm$ 27.35	0.06	178.86 $\pm$ 30.61	0.79**	–
	63	154.43 $\pm$ 20.98		209.07 $\pm$ 27.53		

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** r value.

aflatoxin on the hematological parameters of lambs that received high doses of aflatoxin (2 mg of aflatoxin/kg of diet). In the present study, lymphocyte 0.5% ($p < 0.05$), red blood cell 6.7% ($p < 0.01$) significantly increased in the control groups of cows 63 d. after the beginning of the research. However, there was no deviation from physiological values. In contrast to our results, Tripathi et al. (2008) observed the reduction of eosinophils count and mean cell haemoglobin concentration and increased haematocrit parameter under daily doses of AFB₁ 50 µg/kg DM, 91 days. In our study, in the experimental group of cows, these parameters were not significantly affected by diets.

The cows fed with mycotoxin-contaminated feeds significantly elevated serum metabolites including urea, protein, aspartate aminotransferase, glutamate dehydrogenase and gamma glutamyl transferase (Chaiyotwittayakun 2010). Serum enzyme activities

are generally elevated in mycotoxicosis suggesting mild hepatocellular injury (Pier 1992, Fink Grammels 2008). Serum activities of alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gammaglutamyl transferase (GGT) were estimated to assess liver function. Serum activities of GGT were higher 15% ($p < 0.05$) in the control group of cows and in the experimental group of cows 1.7% ($p < 0.05$) 63 d. after the beginning of the research. Serum activities of ALP were significantly 10.3% ($p < 0.01$) higher, 63 d. after the beginning of the research in the control group of cows. In the experimental group of cows, ALP activities were significantly lower 5.3% ($p < 0.01$) on 63 d. Serum AST activities were significantly 1.2% ($p < 0.01$) lower in the control group. In the experimental group of cows, AST activities were significantly 16.81% ($p < 0.05$) higher 63 d. after the beginning of the research as compared with that found at the start of research. All these par-

ameters were not higher than the physiological limits in both groups of cows in our study. Tripathi et al. (2008) observed no significant differences in the hepatic enzyme activities (AST, acid and alkaline phosphatase), suggesting that the levels of mycotoxins (aflatoxin) in this study caused only a low and transient negative effect on sheep hepatocytes. Ling et al. (2006) reported that feeding a group of cows with wheat contaminated with *Fusarium* spp. containing 8.21 mg DON/kg DM and 0.09 mg ZEA /kg DM caused the increase in serum AST, LDH and GGT values conditioned by the amount of ingested dietary mycotoxin.

Urea and creatinine concentrations in blood serum increased and amounted to respectively 57% ($p>0.05$), 19.49% ($p<0.05$) in the control and 32.3% ($p<0.05$), 26.17% ($p<0.05$) in the experimental groups 63 d. after the beginning of the research. However, the urea concentration was higher 29.12% than the physiological limit for this animal species in the control groups and this effect was prevented by dietary supplementation with Mycofix Plus 3.E. Danicke et al. (2005) observed that postprandial rumen fluid ammonia concentrations were consistently higher when *Fusarium* mycotoxin-contaminated wheat was fed to cows. Moreover, the flow of microbial protein and utilizable protein at the duodenum were simultaneously reduced. These results suggest that diets naturally contaminated with DON as the major mycotoxin can alter microbial protein turnover in the rumen (Korosteleva et al. 2007). The present result is in agreement with that obtained by Smith et al. (2007) when the feeding of contaminated with mycotoxins feedstuffs resulted in a continuous elevation in serum urea concentrations throughout the experiment and this effect was prevented by dietary supplementation with GMA.

The albumin and protein levels are further indicators of the liver function (Tripathi et al. 2008). In our study, total serum protein and albumin concentrations were not significantly increased after 63 d. in both groups of cows. However these parameters were not higher than physiological limits. These results are in contrast to those obtained by Korosteleva et al. (2007) who fed cows naturally contaminated feed with DON, ZEA and 15-acetyl-deoxynivalenol, resulting in significant increase in total serum protein concentration.

The reduction in concentrations of serum IgA in cows fed a contaminated diet illustrates the immunosuppressive effect of *Fusarium* mycotoxins (Korosteleva et al. 2007). Ingested DON affects intestinal Ig synthesis. Specifically, DON stimulates intestinal IgA production in mice, leading to an elevated concentration of circulating serum (Vahedi 2012). In the

present study, Ig A levels in cow serum decreased 16.17% ($p>0.05$) in the control group and significantly increased 14.45% ($p<0.01$) in the experimental group 63d. after the beginning of the research. The present result is in agreement with that obtained by Korosteleva et al. (2007), in which declines in total serum IgA were observed in deoxynivalenol, zearalenone and 15-acetyl DON toxin-treated dairy cows.

Conclusions

The present results indicate that the feed naturally contaminated with low concentration of mycotoxins produced by *Fusarium*, and *Aspergillus* spp. in diet of dairy cows can have an influence on somatic cell count, blood parameters and immunity of dairy cows. The feeding of Mycofix Plus 3.E can prevent many of these effects.

References

- Chaiyotwittayakun A (2010) Mycotoxins and health in dairy cattle. In Globalization of tropical animal diseases and public health concerns. Proceedings of the 13th Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine (AITVM) Conference, Bangkok, Thailand, pp 221-223.
- Danicke S, Matthäus K, Lebziel P, Valenta H, Stemme K, Ueberschar KH, Flachowsky G (2005) Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutri (Berl)* 89: 303-315.
- Devreese M, De Backer P, Croubels S (2013) Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82: 181-190.
- European Commission (2006) Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off. J. Eur. Union* 229: 7-9.
- Fink-Gremmels J (2008) Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Addit Contam Part A*, 25: 172-180.
- Fernandez A, Hernandez M, Verde MT, Sanz M (2000) Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *Can J Vet Res* 64: 53-58.
- Gajecka M, Jakimiuk E, Polak M, Otrocka-Domagala I, Janowski T, Zwierzchowski W, Obremski K, Zielonka L, Apoznanski J, Gajecki M (2004) Zearalenone applied per os provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. *Pol J Vet Sci* 7: 59-66.
- Khatoun A (2012) Ruminant microflora, mycotoxin inactivation by ruminal microflora and conditions favouring mycotoxicosis in ruminants: a review. *Inter J Vet Sci* 1: 37-44.
- Korosteleva SN, Smith TK, Boermans HJ (2007) Effects of Feedborne *Fusarium* Mycotoxins on the Performance, Metabolism, and Immunity of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 90: 3867-3873.

- Mallmann CA, Dilkin P, Mallmann AO, Tyska D (2009) Mycotoxin: impacts and control strategies. Zopollato M, Muraro GB and Nussio LG (eds) In: Proceedings of International Symposium Forage Quality Conservation. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, SP, Brazil, pp 269-280.
- Mansfield MA, Kuldau GA (2007) Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia* 99: 269-278.
- Marczuk J, Obremski K, Lutnicki K, Gajęcka M, Gajęcki M (2012) Zearalenone and deoxynivalenol mycotoxicosis in dairy cattle herds. *Pol J Vet Sci* 15: 365-372.
- Morgavi DP, Riley RT (2007) An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Anim Feed Sci Tech* 137: 201-212.
- Pier AC (1992) Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Anim Sci* 70: 3964-3967.
- Purwin C, Śaniewska-Trokenheim S, Warminska-Radyko I, Tywoneczuk J (2006) Silage quality: microbiological, health-promoting and production aspects. *Med Weter* 62: 865-869.
- Rasmussen RR, Rasmussen PH, Larsen TO, Bladt TT, Binderup ML (2011) *In vitro* cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. *Food Chem Toxicol* 49: 31-44.
- Sutkevičius J (2003) Veterinary clinical diagnostic (In Lithuanian). Kaunas: Naujas lankas, pp 41-217.
- Seeling K, Lebzien P, Danicke S, Spilke J, Sudekum KH, Flachowsky G (2006) Effects of level of feed intake and *Fusarium* toxin-contaminated wheat on rumen fermentation as well as on blood and milk parameters in cows. *J Anim Physiol Anim Nutr* 90: 103-115.
- Smith TK, Diaz-Llano G, Korosteleva SN, Yegani M (2007) Significance of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on livestock health and reproduction. In: Aland A and International Society for Animal Hygiene (eds) Proceedings of the 13th International Congress in Animal Hygiene: „Precision livestock farming – health and welfare aspects”. Vol I, Tartu, Estonia, pp 698-694.
- Tripathi MK, Mondal D, Karim SA (2008) Growth, haematology, blood constituents and immunological status of lambs fed graded levels of animal feed grade damaged wheat as substitute of maize. *J Anim Physiol Anim Nutr* 92: 75-85.
- Vahedi G (2012) Effect of *Fusarium* Contaminated Diet on Innate and Adaptive Immune Response in Rabbit Model. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 4: 36-40.
- Whitlow LW, Hagler WM (2002) Mycotoxins in feeds. *Feed-stuffs* 74: 1-10.
- Whitlow LW, (2005) Molds and Mycotoxins in Feedstuffs – Prevention and Treatment. Proceedings of the 16th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp 123-142.

MYCOTOXINS AND BIOGENIC AMINES CONTENT AND THEIR CHANGES DURING STORAGES IN PRODUCED IN LITHUANIA IN MAIZE SILAGES

Jurgita Jovaišienė¹, Bronius Bakutis¹, Violeta Baliukonienė¹, Paulius Matusevičius², Krzysztof Lipiński³, Zofia Antoszkiewicz², Maja Fijałkowska³

¹*Department of Food Safety and Quality, Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės 18, LT-47181; Kaunas, Lithuania, Phone +370 37 363208; e-mail: jurgita.jovaisiene@ismuni.lt*

²*Department of Animal Breeding and Nutrition, Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės 18, LT-47181; Kaunas, Lithuania*

³*Department of Animal Nutrition and Fodder Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn
PL 10-718, Olsztyn, Oczapowskiego 5, Poland*

Abstract. The aim of the current work was to evaluate mycotoxins and biogenic amines contents and their changes during storage in maize silages produced in Lithuania after 3 and 8 months of ensilage. Maize silages samples were collected from 20 conventional dairy farms in Lithuania.

Mycotoxins were quantified by direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The highest ZON, DON and OTA contents, respectively 880.04±60.62, 2600.0±260.0 and 29.15±5.6 µg/kg were found in silage samples after 3 months of storage. T-2/HT-2 (T-2 and HT-2 toxins) and aflatoxin total (AFL (total)) respectively 147.25±20.80, 20.05±5.33 µg/kg - after 8 months of storage. The amount of biogenic amines (BA) was determined by high-performance liquid chromatography. The highest biogenic amines content in maize silage samples were found in samples after 3 months of storage. The present study indicates that maize silage is an important source of mycotoxins and biogenic amines in the diet of cattle.

Keywords: mycotoxins, biogenic amines, volatile fatty acids, maize silage

Introduction

About 70 percent of all growing corn is used for the green fodder production. Maize silage is the main ruminant livestock feed in many European countries. The quality of raw milk and dairy products is related primarily to the quality of silage fed to cows (Purwin et al., 2006). Currently, silage quality is evaluated by chemico-fermentative parameters. However, the presence of bacteria, moulds, and/or some of their metabolites, i.e., mycotoxins, must be considered because of their effects on animal production and health (Chelia et al., 2013). Because the use of silage is increasing, risk assessment for mycotoxins becomes important as it concerns human and animal safety as well as animal performance (Pereyra et al., 2008). Little attention has been paid to the content of different protein end-products in silage and their effect on the animal organism (Olt et al., 2005). Biogenic amines (BA) are low-molecular-weight nitrogenous organic bases, which can accumulate in high concentration in food or feed due to microbial activity and cause toxic effects. In some fermented foods or feed it is difficult to prevent the accumulation of BA since the microbiological/chemical/physical conditions of the fermentation can not be easily modified. The production of BA has been associated with yeast (*Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii*, *Geotrichum candidum*) Gram-negative (*Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas* spp. or *Serratia* spp.) and Gram-positive bacteria (lactic acid bacteria (LAB) (Alvarez et al., 2014). BA high levels were reported even in maize silages as amines are produced by decarboxylation of amino acids not only by enzymes of putrefactive bacteria but also of many species and strains of lactic acid bacteria (Křížek et al., 1993; Steidlová et al., 2002).

With the changes in agricultural practices towards all-year feeding of silages, silages are often 14 months or more old at the time of feeding. A better understanding of the long-term dynamics of silage is therefore important to optimize long-term storage, minimize fungal deterioration and decrease the risk of mycotoxins in silages (Storm et al., 2010). BA concentration in silages depends on the process of microbiological decarbonization of amino acids. The level of amine concentrations is mainly the result of the action of lactic fermentation bacteria and *Enterobacteriaceae* (Hernández-Orte et al., 2008).

This study evaluated mycotoxins and biogenic amines content and their changes during storage in maize silages produced in Lithuania after 3 and 8 months of ensilage.

Materials and methods

Maize samples were collected from 20 conventional dairy farms in Lithuania. The sampling sites located all over the country: from centre, west, south parts of country. From each silo were taken three samples from different places and made mixed sample. The samples were transported in polyethylene bags with minimum air content. Samples immediately were freeze at -20°C and kept until the beginning of the laboratory analyses. Samples of spoiled silage with visible fungal growth were not sampled. Silages samples from the same farms were sampled three times. Silage was preserved by spontaneous fermentation, without biological additives.

The dry matter (DM) was analyzed on the day of sampling. In order to determinate dry matter, the maize samples were chopped in 4 cm-diameter-particles and dried for 18 hours at 55°C. After the air equilibration, the samples were

weighed and then dried again for 6 hours at 105°C. Crude protein (CP) were analyzed by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS-6500)

The pH was measured in diluted silage with a pH-meter (WTW®inoLab pH 720, Germany) fitted with a glass electrode after homogenization of 10 g silage with 40 ml of distilled water. The content of ammonia nitrogen was determined by the Conway's micro-diffusion method.

The concentration of VFA, lactic acid and ethanol content were determined in silage extract by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Kostulak-Zielińska and Potkański (2001), Gąsior (2002). The fresh maize silage samples were homogenized in a manual blender (Bosch), in an ice bath (for 2 min), pouring in water five times more than the weight of the given sample. The homogenate was filtered by straining through miller gauze; the filtrate was passed through a soft filter (Filtrak No. 388), deproteinised with 24% (w/v) metaphosphoric acid (FLUKA) and centrifuged (7 min., 10000 × g at 4°C) in an MPW-350R centrifuge. The supernatant was filtered (0.22-µm PTFE syringe filter 30-SF-02 CHROMACOL LTD) and analysed by a SHIMADZU HPLC system, RP, column: METACARB 67H (ORGANIC ACIDS COLUMN, Varian), mobile phase: 0.002 M (v/v) sulphuric acid solution (95%, Sigma-Aldrich) in deionised water, flow rate 1 cm³/min., loop 20 µl, detector SDP-20A UV/Vis - 210 nm). The external-standard method was employed using the FLUKA lactic acid standard and the SUPELCO standards of acetic, propionic and butyric acids. A mixture of standards was prepared: lactic acid 3 mg/cm³, acetic acid 0.5 mg/cm³, propionic acid 0.495 mg/cm³, butyric acid 0.482 mg/cm³. The area of peaks from the sample was compared with the area of peaks from the standards.

The amount of biogenic amines was determined by high-performance liquid chromatography using the Shimadzu HPLC system according to Joosten and Olieman (1986), Gąsior and Brzóska (1999). The extraction of the amines: 50 g ground maize silage sample (robot coupe® Blixer® 3) were homogenized in a manual blender (Bosch), in an ice bath and 250.0 cm³ distilled water (for 2 min.). A portion of the filtrate (5 cm³) of this suspension was mixed with 0.5 cm³ 55% (w/v) of trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged for 10 min at 10 000 × g and 4°C. After centrifuging the supernatant was filtered (0.22-µm PTFE syringe filter 30-SF-02 CHROMACOL LTD). High-performance liquid chromatography (HPLC) Shimadzu system (RP) with a column Nucleosil-C18 250/4, post-column derivatization with ninhydrin at the temperature of 145°C, the phase of the carrier on the basis of DMSO, UV-VIS detector 546 nm, the patterns of biogenic amines SIGMA Mycotoxins analysis. Whole maize silage samples were air-dried, ground to pass a 1 mm screen and homogenized. The silage samples were determined by direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (AOAC, 2000). Contamination with total aflatoxins (AFL), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) and T-2 toxin/HT-2, Ochratoxin A (OTA) toxin was tested. The Veratox test kits (Neogen Corporation, Scotland), approved by the AOAC Research Institute (Certificate No. 950702) were used for the analysis. OTA was tested with the RIDASCREEN test kits ('R-Biopharm AG', Germany). Mycotoxin extraction and tests were performed according to manufacturer's instructions. Extraction of samples was carried out in distilled water for DON, in methanol:water (70:30 v/v) for AFL, ZEN. Absorbance was determined using the micro well strip reader (Neogen, USA) at 650 nm. The measured absorbance was automatically converted to the mycotoxin concentration units – µg/kg. The results were estimated taking into account the lowest calibration curve's mycotoxin concentration value (LOD-limit of detection), which is for AFL – 2.0 µg/kg, ZEN – 10.0 µg/kg, DON – 100.0 µg/kg, T-2/HT-2 – 10.0 µg/kg, OTA – 5 µg/kg.

For determination of fungal colony-forming units per sample (CFU/g) 10 g of each sample was suspended into 90 ml of sterile water and shaken for 20 min. A dilution series (from 10⁻¹ to 10⁻³) was prepared from the obtained suspension. 1 ml of suspension from each dilution series was uniformly dispensed under the surface standard agar Czapek-Dox (Oxoid) supplied with chloramphenicol (50 mg/l) (Sigma) in Petri-dishes and incubated for 5-7 days at 26±2°C in dark. For identification of lactic acid bacteria (LAB) count performed according LST ISO 15214:2009 „Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 °C (ISO 15214:1998, identical)“. Results of microbiological analysis of total fungi spores count in silage, using mathematical method of logarithm, transferred into log₁₀ CFU/g.

Statistical analysis was carried out using SPSS software (version 12.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Specific means differences were identified with LSD's multiple range tests. Pearson correlation coefficients between silage fermentation quality parameters and the individual mycotoxins, biogenic amines contents were calculated. Values are presented as means ± standard error (SE) and were considered statistically significant when P ≤ 0.05.

Results and Discussion

Findings of the present study revealed that all samples of maize silage were contaminated with mycotoxins and biogenic amines (BA) (Table 1).

A high incidence of co-occurrence of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) in maize silage is observed globally, while the incidence of other mycotoxins widely differs as a result of regional differences in environment conditions (Chelia, 2013). Virtually all toxins have been found in fresh forages and can also be detected in preserved forage. However, with increasing storage time, the toxin burden is often reduced due to acidic anaerobic fermentation activity that may metabolise some of the mycotoxins present at harvest (Fink-Gremmels, 2005). Składanka et al. (2013) indicated that mycotoxins generally not degraded by the ensiling process. In the present study, 15% tested samples from fresh maize were positive for AFL (total). Eighty percent silage samples after 3 months of storage and 75% after 8 months of storage were positive for AFL (total). Mycotoxins levels between fresh and fermented silage samples showed

significant differences ($P \leq 0.05$). The maize plants arrive to the silo contaminated with *Aspergillus* strains could provide initial aflatoxin levels present in the silage. In the present study, only three fresh maize samples were positive for aflatoxin contamination. Pereyra et al. (2008) suggests that the prevailing environmental conditions could allow aflatoxin production by the potential aflatoxin producers initially present.

All samples were observed contaminated with *Fusarium* mycotoxins ZEA and DON. In the fresh cut material 45% samples and all fermented silage samples were found positive for T-2/HT-2 (T-2 and HT-2 toxins). The European Commission (EC) advisory guideline for DON is 5000 µg/kg of dry matter. In the present study DON content increased 36.92% ($P \leq 0.05$) in silage 3 months of storage and decreased 31.81% ($P \geq 0.05$) 8 months of storage. This result is in contrast with Storm et al. (2010) who found concentrations of DON higher (an average concentration - 1056 µg/kg) and T-2 lower (an average concentration - 2 µg/kg) than ours in maize silage samples 3 months after ensilage. The concentrations of DON have not exceeded the maximum allowed concentrations prescribed by EU. Despite the high toxicity of T-2 and HT-2 toxins, guidance or limiting values for feed do not yet exist. The guidance value for ZEA in Europe is 500 µg/kg. The highest ZEA content (37.5%), than EC advisory guideline, was determined in the silage samples 3 months of storage. In the study of Eckard et al. (2011) zearalenone in the maize silage before ensiling was found with a maximum level of 430 µg/kg. Ochratoxin A is frequent contaminant of maize in temperate regions, EC advisory guideline for OTA - 250 µg/kg of dry matter.

Histamine, tyramine, putrescine and cadaverine are reported as undesirable silage constituents, wide year-to-year variations (Duniere et al., 2013). In the current study the highest biogenic amines content in maize silage samples were found in samples after 3 months ($P \geq 0.05$) of storage where DM content was lower. Cadaverine content in the silages samples of 3 and 8 month of storage were higher than contents of other amines. Histamine was detected at lower content than contents of the other amines. In the study of Nishino et al. (2007) histamine was detected in the maize silages at low levels (< 10 mg kg⁻¹ DM), tyramine, putrescine and cadaverine were produced at about 400, 70 and 200 mg kg⁻¹ DM, respectively. Steidlova and Kalac (2002) determined values of BA in 51 corn silage samples and BA composition was 145 mg/kg of tyramine, 136 mg/kg of putrescine, 96.2 mg/kg of cadaverine, 37.9 mg/kg of spermidine, 3 mg/kg of histamine, 2.8 mg/kg of spermine and 2.5 mg/kg of tryptamine. McDonald et al. 1991 related to the evidence that histamine is produced solely by an action of microbial decarboxylase, whereas tyramine, putrescine and cadaverine are also produced by plant enzymes (Nishino et al., 2007).

Table 1. Parameters of maize silage

Parameters	Fresh-cut material	After 3 months of storage	After 8 months of storage
Dry matter	369.62±14.50 ^a	331.73±10.56 ^b	405.17±17.69 ^a
Crude proteins	79.12±1.47 ^a	78.83±1.43 ^a	71.29±2.39 ^b
pH	5.26±0.12 ^a	3.84±0.05 ^b	3.93±0.08 ^b
NH ₃ -N	-	10.55±0.53 ^a	11.06±0.55 ^a
Lactic acid	-	19.66±2.43 ^a	15.40±2.48 ^a
Acetic acid	-	2.34±0.24 ^a	1.32±0.19 ^b
Butyric acid	-	2.53±0.23 ^a	1.94±0.20 ^a
Propionic acid	-	0.70±0.33 ^a	2.16±0.49 ^b
Ethanol	-	0.99±0.34 ^a	0.71±0.38 ^a
AFL(total)	0.94±0.51 ^b	16.86±3.96 ^a	20.05±5.33 ^a
ZEA	206.88±31.52 ^c	880.04±60.62 ^a	380.42±19.20 ^b
DON	1640.0±40.0 ^b	2600.0±260.0 ^a	1118.3±160.35 ^b
T-2/HT-2	40.21±18.23 ^b	141.48±23.37 ^a	147.25±20.80 ^a
OTA	-	29.15±5.6 ^a	18.95±4.86 ^a
Histamine	-	13.41±4.12 ^a	8.98±5.07 ^a
Tyramine	-	114.10±20.14 ^a	81.58±27.13 ^a
Putrescine	-	191.38±26.65 ^a	149.91±37.65 ^a
Cadaverine	-	898.22±248.65 ^a	633.57±328.23 ^a
Fungi, log ₁₀ CFU/g	4.74 ^b	4.49 ^b	5.29 ^a
LAB, log ₁₀ CFU/g	7.09 ^b	7.28 ^b	7.56 ^a

Values in the same rows with different following letters are significantly different ($P \leq 0.05$), LSD's multiple range test. Values are the means ± SEM; LAB-lactic acid bacteria.

The combination of moisture, temperature, increasing pH and availability of nutrients and oxygen are among the important factors can have a significant proportionate influence on annual fluctuation in mycotoxin concentrations (Chelia, 2013). Formation of BA can be affected by several factors such a temperature, rapidity of pH decrease during the initial stage of fermentation, and oxygen availability (Steidlová et al., 2004; Duniere et al., 2013). Correlation coefficient between mycotoxins, amine contents and silage quality parameters are given in Table 2. According Driehuis et al. (2008)

production of DON and zearalenone in forage maize occurs during growth in the field and is affected, among other factors, by weather conditions. Neither of these mycotoxins is affected by ensiling, the concentrations detected in silage reflect the contamination levels at the time of harvesting. In the study of Krnjaja et al. (2013) a significant positive correlation has only been found between moisture content and DON ($r=0.61$), while for the other mycotoxins tested this correlation was negative for AFB1 ($r=-0.07$), ZON ($r=-0.25$). In the present study, weak not significant correlation was found between moisture and all tested mycotoxins contents in the fresh cut material samples and positive not significant correlation between moisture and mycotoxins was found in the silages samples 3 and 8 months after ensilage, while significant positive this correlation was found between moisture content and DON ($r=0.67$).

It were found strong negative correlations between pH and ZEN ($P\leq 0.05$) and T-2 ($P\leq 0.05$) toxins and no similar correlations were observed between BA and silage fermentation parameters in the all fermentation stages. The incidence of toxin metabolism under low pH conditions during the storage period on the toxin burden of mature silages depends on the pH sensitivity of different toxins. An increase, a decrease or no change was reported for the levels of different mycotoxins during ensiling (Cheli et al., 2013).

Hernández-Orte et al. (2008) maintain that together with the growing population of lactic bacteria, levels of biogenic amines also increase which can be connected with the growing concentrations of acetic and lactic acids. In the present study, the correlation coefficient between LAB and the different BA was weak, while histamine coefficient in maize silage samples after 8 month of ensilage was 0.68 ($P\leq 0.05$).

Table 2. Correlation (Pearson coefficients) coefficient between mycotoxins ($\mu\text{g/kg DM}$), biogenic amines contents (mg/kg DM) and maize silage fermentation parameters

Parameter	DM (g/kg)	pH	NH ₃ /kg N	Lactic acid (g/kg)	Acetic acid (g/kg)	Propioni c acid (g/kg)	Butyric acid (g/kg)	Ethanol	Crude proteins (g/kg)	Fungi, log ₁₀ CFU/g	LAB, log ₁₀ CFU/g
Fresh-cut material											
AFL (total)	-0.11	-0.33	-	-	-			-	-0.11	-0.11	0.39
ZEA	-0.05	-0.56**	-	-	-			-	0.18	0.03	0.02
DON	-0.24	-0.15	-	-	-			-	0.10	-0.05	0.03
T-2/HT-2	-0.16	-0.53*	-	-	-				-0.13	-0.22	0.03
after 3 months of storage											
AFL (total)	0.08	-0.30	-0.68*	-0.14	-0.02	0.33	-0.25	0.25	-0.16	0.11	-0.11
ZEA	0.24	-0.50**	-0.21	0.15	-0.17	-0.02	0.05	-0.38	-0.05	0.44	-0.56**
DON	-0.003	-0.35	-0.11	-0.28	-0.30	-0.15	-0.65*	-0.21	-0.27	-0.17	-0.02
T-2/HT-2	0.02	0.26	0.57	-0.10	-0.05	-0.28	-0.46	-0.53	0.13	0.32	0.06
OTA	0.39	-0.02	-0.03	-0.06	-0.02	0.34	-0.47	0.32	-0.23	-0.21	-0.12
Histamine	-0.19	0.42	0.18	0.12	0.15	-0.39	-0.01	0.43	-0.31	-0.33	0.24
Tyramine	-0.64*	-0.03	0.28	0.30	-0.29	0.627*	-0.08	0.04	-0.42	-0.7	0.18
Putrescine	-0.57	0.002	-0.01	0.07	-0.06	-0.45	-0.04	0.24	-0.40	-0.22	0.01
Cadaverine	-0.26	0.07	0.37	0.11	0.15	-0.51	-0.16	0.13	0.01	-0.20	0.21
after 8 months of storage											
AFL (total)	0.21	0.10	0.37	0.24	0.24	0.66*	0.46	0.40	0.21	-0.48	0.30
ZEA	0.16	-0.71**	-0.11	0.58	-0.29	-0.35	-0.03	-0.20	0.04	-0.12	-0.07
DON	0.67*	-0.24	0.12	0.18	-0.24	-0.07	0.04	0.20	0.08	0.06	0.04
T-2/HT-2	0.07	-0.82**	0.12	0.73**	0.37	-0.34	0.73**	-0.10	0.38	0.27	0.20
OTA	0.07	-0.02	-0.03	0.11	-0.12	0.36	0.09	0.14	-0.15	0.13	0.76**
Histamine	-0.38	-0.01	0.03	0.36	0.10	0.38	0.34	-0.08	-0.08	-0.11	0.68*
Tyramine	-0.30	-0.05	0.39	0.30	-0.41	0.13	0.13	0.68*	0.26	-0.14	-0.38
Putrescine	0.33	0.17	0.23	0.14	-0.27	0.41	0.26	0.75**	0.57	-0.03	-0.04
Cadaverine	0.38	0.32	0.28	0.06	-0.48	0.54	-0.01	0.82**	0.46	-0.20	-0.03

* $P\leq 0.05$; ** $P\leq 0.05$.

Nishino et al. (2007) reported that ammonia was positively strong ($r=0.845$) related with the BA contents in silage, in the present study weak not significant correlation was found between NH₃-N and the different BA contents. The concentrations of NH₃-N and butyric acids represent good indicators for biogenic amines ($r=0.67$ and $r=0.80$, $P\leq 0.05$) there have been high concentrations of biogenic amines in the low-DM silages (Richardt et al., 2011). Commonly, amine content increased with decreasing dry matter level (Steidlová et al., 2004). In the current study were found strong negative correlations ($r=0.64$, $P\leq 0.05$; $r=-0.57$, $P\geq 0.05$) between dry matter and tyramine, putrescine respectively in silage samples after 3 month of ensilage. Macana et al. (2006) maintain that the activity of bacterial proteases and, consequently, development of biogenic amines is correlated with the following: content of amino acids, synergistic action of

microorganisms as well as with ensiling conditions.

Conclusions

The present results indicate that mycotoxins were generally not degraded by the ensiling process and the presence of biogenic amines in maize silage. Despite the significant presence of mycotoxins (DON, AFL (total), OTA) in the maize silage the concentrations has not exceed the maximum allowed concentrations prescribed by EU. Combined effects of toxic compounds as mycotoxins and biogenic amines are considered to limit palatability and influenced health of ruminants.

References

1. Alvarez M. A., Moreno-Arribas M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*. 2014. 39(2). P. 146-155.
2. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, International. 2005.
3. Cheli F., Campagnoli A., Dell'Orto V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*. 2013. 183. P. 1-16.
4. Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of DON, ZEA, ochratoxin A, T-2 and HT-2 toxins, and fumonisins in products intended for animal feeding.
5. Driehuis F., Spanjer M. C., Scholten J. M., Te Giffel M. C.. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 2008. 1(1). P. 41-50.
6. Duniere L., Sindou J., Chaucheyras-Durand F., Chevallier I., Thevenot-Sergent D. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed and Sciences Technology*. 2013. 182. P. 1-15.
7. Eckard S., Wettstein F. E., Forrer H. R., Vogelgsang S. Incidence of Fusarium Species and Mycotoxins in Silage Maize. *Toxins*. 2011. 3. P. 949-967.
8. Fink-Gremmels J. Mycotoxins in forages. In: Diaz, D.E. (ed.) *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 2005. P. 249-268.
9. Gąsior R. Oznaczanie lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego w kiszoncek i treści zwacza. Instytut Zootechniki, Balice, Kraków 2002. (In Polish)
10. Gąsior R., Brzóska F. The type and level of biogenic amines in alfalfa and red clover silage. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie*. 1999. Vol. 347. P. 89-94. (in Polish)
11. Hernández-Orte P., Lapeña A. C., Peña-Gallego A., Astrain J., Ferrer B., Cacho J., Ferreira V.: Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. *Food Res. Internat*. 2008. 41. P. 697-706.
12. Joosten H.M., Olieman C. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by HPLC in combination with thermo-sensitized reaction. *J. Chromatogr*. 1986. 356. P. 311-319.
13. Kostulak-Zielińska M., Potkański A. Quality of baled grass-clover silage ensiling with chemical additives. *Chemical composition. Annals of Animal Science*. 2001. 1. P. 153-165.
14. Krížek M., Kaláč P., Peterk, J. Biogenic amines in silage. 3. The occurrence of six biogenic amines in farm-scale grass and maize silages. *Archives of Animal Nutrition*. 1993. 45. P. 131-137.
15. Krnjaja V., Lević J., Stanković S., Petrović T., Tomić Z., Mandić V., Bijelić Z. Moulds and mycotoxins in stored maize grains. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2013. 29(3). P. 527-536.
16. Macana J., Turk R., Vukušić J., Kipčić D., Milković-Kraus S. Long-term follow-up of histamine levels in a stored fish meal sample. *Anim. Feed Sci. Technol*. 2006. 127. P. 169-174.
17. Nishino N., Hattori H., Wada H., Touno E. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. 103 P. 325-332.
18. Olt A., Kärt O., Kaldmäe H., Ots M., Songisepp E., Smidt I. The effect of additive and dry matter content on silage protein degradability and biogenic amine content. *Journal of Agricultural Science*. 2005. Available at: http://agrt.emu.ee/pdf/2005_2_olt_i.pdf
19. Pereyra M.L., González Alonso V.A., Sager R., Morlaco M.B., Magnoli C.E., Astoreca A.L., Rosa C.A.R., Chiacchiera S.M., Dalcero A.M., Cavaglieri L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology*. 2008. 104. P. 1034-1041.
20. Purwin C., Łaniewska-Trokanheim Ł., Warminińska-Radyko I., Tywończuk J. Jakość kiszzonek – aspekty mikrobiologiczne, zdrowotne i produkcyjne. *Medycyna Wet*. 2006. 62(8). P. 865-869.
21. Richardt W., Wein R., Steinhöfel O., Pries M. Untersuchungen zur Veränderung der Proteinqualität während der Silierung von Grassila-gen unter Berücksichtigung biogener Amine. *VDLUFA-Schriftenreihe*. 2011. 67. P. 541-549.
22. Steidlová Š., Kaláč P. The effects of lactic acid bacteria inoculants and formic acid on the formation of biogenic amines in grass silages. *Archives of Animal Nutrition*. 2004. 58(3). P. 245-254.
23. Składanka J., Adam V., Dolezal P., Nedelnik J., Kizek R., Linduskova H., Mejia J. E. A. Nawrath A. How Do Grass Species, Season and Ensiling Influence Mycotoxin Content in Forage? *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013. 10. P. 6084-6095.

24. Steidlová Š., Kaláč P. Levels of biogenic amines in maize silages. *Animal Feed Science and Technology*. 2002. 102. P. 197–205.
25. Storm I.M.L.D., Kristensen N.B., Raun B.M.L., Smedsgaard J., Thrane U. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *Journal of Applied Microbiology*. 2010. P. 1017–1026.

Received 14 June 2016

Accepted 22 July 2016

PUBLIKACIJA III (PUBLICATION III)

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.69, n.2, p.269-277, 2017

Biogenic amines and mycotoxins concentrations in baled silage from organic and conventional farms

[Concentrações de amins biogênicas e micotoxinas em silagem embalada de fazendas orgânicas e convencionais]

J. Jovaišienė¹, B. Bakutis¹, V. Baliukonienė¹, P. Matusėvičius¹, K. Lipiński², Z. Antoszkiewicz², M. Fijałkowska²

¹Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences - Kaunas, Lithuania

²University of Warmia and Mazury in Olsztyn - Olsztyn, Poland

ABSTRACT

The aim of the current study was to investigate biogenic amines and mycotoxins concentrations in baled silage (mainly *Poaceae* family grasses) prepared in organic and conventional farms and to relate these parameters to fermentative parameters. The mean dry matter (DM) content was 364.10±93.31 and 424.70±95.93g/kg in the silage from organic and conventional farms respectively. The silage samples from organic farms had 17.00% higher ($P \leq 0.05$) tyramine (TY) than the silage from conventional farms. Conventional farm samples were characterized by 46.00% higher histamine (HIS) ($P \leq 0.05$), 9.80% higher putrescine (PUT) ($P \leq 0.05$), 17.30% higher cadaverine (CAD) ($P \leq 0.05$). Aflatoxins (AFL) (total) and zearalenone (ZEN), T-2/HT-2 concentrations were higher respectively 16.00% ($P \leq 0.05$) and 13.40% ($P \leq 0.05$), 1.80% ($P \leq 0.05$) in the silage prepared in organic farms. Deoxynivalenol (DON) concentration was higher 42.40% ($P \leq 0.05$) in silage from conventional farms. Volatile fatty acids (VFA), lactic acid, ethanol, pH and ammonia nitrogen showed that the silage samples from organic and conventional farms were of good quality. Our study suggests differences in biogenic amine formation or mycotoxins content in silage from organic and conventional farming, but, overall, the measured values are too low to be relevant for animal health. Furthermore, these differences might as well be due to the difference in dry matter content and plant maturity between the organic and conventional silage samples.

Keywords: biogenic amines, mycotoxins, volatile fatty acids, organic farm, conventional farm

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar concentrações de amins biogênicas micotoxinas em silagem embalada (principalmente gramíneas da família *Poaceae*) preparada em fazendas orgânicas e convencionais e relacionar esses parâmetros a parâmetros fermentativos. A massa seca média (MS) foi 364,10±93,31 e 424,70±95,93g/kg na silagem de fazendas orgânicas e convencionais, respectivamente. As amostras de silagem de fazendas orgânicas tinham 17% a mais de tiramina (TY) ($p \leq 0,05$) que as de fazendas convencionais. As amostras de fazendas convencionais foram caracterizadas por histamina (HIS) 46,00% mais alta ($P \leq 0,05$), 9,80% putrescina (PUT) mais alta ($P \leq 0,05$), 17,30% de cadaverina (CAD) mais alta ($P \leq 0,05$). Aflatoxinas (AFL) (total) e zearalenone (ZEN), T-2/HT-2 tinham concentrações mais altas em respectivamente 16,00% ($P \leq 0,05$) e 13,40% ($P \leq 0,05$), 1,80% ($P \leq 0,05$) na silagem preparada em fazendas orgânicas. Deoxinivalenol (DON) tinha concentração mais alta 42,40% ($P \leq 0,05$) na silagem de fazendas convencionais. Ácidos graxos voláteis (AGV), ácido láctico, etanol, pH e nitrogênio de amônia mostraram que as amostras de silagem de fazendas orgânicas e convencionais tinham boa qualidade. Nosso estudo sugere diferenças na formação biogênica de amônia ou micotoxinas em silagem de fazendas orgânicas ou convencionais mas, em geral, os valores medidos foram muito baixos para serem relevantes à saúde animal. Ademais, essas diferenças podem ser devido à diferença na matéria sólida e maturidade da planta entre as amostras de silagem orgânica e convencional.

Palavras chave: amins biogênicas, micotoxinas, ácidos graxos voláteis, fazenda orgânica, fazenda convencional

Recebido em 23 de junho de 2016

Aceito em 23 de junho de 2016

E-mail: jurgita.jovaisiene@lsmuni.lt

INTRODUCTION

The main herbage, legumes and legume – grasses are used for cattle feed in Lithuania and these plants' ensilage ensure a uniform level of animal feed year-round (Vrotniakienė and Jatkauskas, 2005). Making silage in the bales is popular both in organic and conventional farms.

A comparative study in Italy on the preservation of lucerne or grass from natural pastures showed that wrapped balls contain more mycotoxins than hay made with the same forage. Considering such a result and the large use of the wrapped ball technique during the last decade, more research on the risk associated with this type of preservation is imperative (Tomasi *et al.*, 1999; Yiannikouris and Jouany, 2002). In Lithuania, during 2008 and 2009, compared silage was produced according to different technologies and the contamination with AFL (total) and DON concentrations were detected at 14.0% ($P>0.05$) and 24.0% ($P>0.05$) higher in silage from bales. ZEN concentration was detected at 3.0% ($P>0.05$) less in silage from bales than from trenches (Baliukonienė *et al.*, 2012).

The challenge from undesirable microorganisms, such as mould, can be relatively high with baled silage (O'Brien *et al.*, 2005). The preservation of silage depends on achieving strict anaerobic conditions within the silo to inhibit aerobic fungi and bacteria. The changes in environmental conditions from pre-ensiling through fermentation result in the establishment of characteristic mycoflora, mainly represented by *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* species. However, during ensiling, most fungi can be eliminated (Mansfield and Kulda, 2007). Deoxynivalenol and zearalenone are the main mycotoxins formed in silage. Their content is reduced by the activity of some lactic acid bacteria in the silage (Kalač, 2011). Boudra and Morgavi's (2008) results indicated that low dry matter at ensiling as well as prolonged storage could be a practical way to reduce or eliminate some *Fusarium* toxins in contaminated silages. However, there are other species, such as *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roqueforti*, *P. paneum*, *F. oxysporum*, and *Monascus ruber* that are able to tolerate both high levels of organic acids and carbon dioxide in addition to low availability of oxygen (Bryden, 2012; O'Brien *et al.*, 2006; Storm *et al.*, 2008). The fermentation

pattern may affect the growth of mould and mycotoxin contamination in silages. Lactic acid and acetic acid have a limited effect on mould growth, whereas propionic acid and butyric acid seem to be more efficient as mould inhibitors. Large differences in preservation quality can be found, and different fungi found in forage may lead to a varied spectrum of toxins. (Chelia *et al.*, 2013). The effects of mycotoxin ingestion are mainly chronic, implying hidden disorders with reduced ingestion, productivity, and fertility (Fink-Gremmels, 2008; Storm *et al.*, 2008).

Little attention has been paid to the content of different protein end-products in silage and their effect on animal organisms. In literature, not much data can be found on the presence of biogenic amines in silage. The data do not reveal the composition of plants, the technology used and the effect of additive on biogenic amines. All biogenic amines served as factors significantly decreasing intake (Olt *et al.*, 2005). In low concentrations, they are essential for the normal growth and differentiation of cells, but in larger quantities are harmful to humans and livestock (Fusi *et al.*, 2004).

Biogenic amines are low molecular weight organic bases present in all organisms. The most common are putrescine, cadaverine, spermine, spermidine, histamine, tryptamine and phenylethylamine (Bardócz *et al.*, 1995). Biogenic amines are naturally present in silage; however, their presence in high concentrations may be a sign of undesirable changes in the fermented forage and has been linked to low feed intake in ruminants (Van Os *et al.*, 1996, 1997; Gąsior and Brzóska, 1999). The most common biogenic amines in silage are putrescine, histamine and tyramine. Studies have proven (Harrison *et al.*, 1994) that biogenic amines have negative impact on dry matter intake as they inhibit ruminal contractions, reduce dry matter digestibility and the passage rate of feed particles in the digestive tract (Phuntsok *et al.*, 1998). Amine formation can be reduced by restriction of fermentation in the silage or by achieving rapid acidification during the first phase of ensiling (Van Os *et al.*, 1996). Formation of BA can be affected by several factors such as temperature, rapidity of pH decrease during the initial stage-of fermentation and oxygen availability (Dunière *et al.*, 2013).

Mycotoxins have been reported in organic produce. One theory is that organically-grown products are likely to contain higher concentrations of mycotoxins than conventionally-grown products (Tamm *et al.*, 2002). However, the common argument that the ban of synthetic fungicides leads to a higher incidence of mould on organically cultivated crops and, therefore, to a higher risk of mycotoxins cannot be confirmed by the reviewed investigations comparing the mycotoxin contents of organic and conventional produce. In some investigations, even lower infestation rates of organically grown cereals with seed pathogens as *Fusarium* spp. and mycotoxins contamination were found than in conventional cereals treated with pesticides (Dabbert *et al.*, 2000). Recent meta-analyses of the literature demonstrated that organic yields of individual crops are similar to those of conventionally managed crops when good management practices are applied (Seufert *et al.*, 2012).

The aim of the present study was to investigate biogenic amines and mycotoxins concentrations in baled silage from organic and conventional farms and to relate these parameters to silage fermentative parameters.

MATERIALS AND METHODS

A total of 20 round baled silage samples (8 months after ensiling) were collected from 20 different farms in Lithuania, ten samples from organic and ten samples from conventional farms. The sampling sites were located all over the country: from the central, western, southern parts (of the country). The silage samples were taken from the centre immediately after opening the bale for feed. From one bale three samples from different places were taken and a mixed sample was made. The samples were transported in polyethylene bags with a minimum air level. The samples were frozen immediately at -20°C and kept until the beginning of the laboratory analyses.

The silage was preserved by spontaneous fermentation, without biological additives. In both farm groups, silage samples were made from the first cut *Poaceae* – *Fabaceae*. The mixture of plants was rich in *Poaceae* grasses: perennial ryegrass, fescue grass with low count of timothy or cocks-foot and undersowed with

red clover. The silage samples were wilted for about 24h.

The dry matter (DM) was analyzed on the day of sampling. In order to determine dry matter, the samples were chopped in 4cm-diameter-particles and dried for 18 hours at 55°C . After the air equilibration, the samples were weighed and then dried again for 6 hours at 105°C . Chemical composition (crude protein (CP), water soluble carbohydrates (WSC), neutral and acid detergent fiber (NDF and ADF)) were analyzed by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS-6500) (AOAC, 2005).

The level of pH was measured in diluted silage with a pH-meter (WTW®inoLab pH 720, Germany) fitted with a glass electrode after homogenization of 10g silage with 40ml of distilled water. Ammonia nitrogen content was determined by the Conway's micro-diffusion method.

The concentrations of VFA, lactic acid and ethanol content were determined in silage extract by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Kostulak-Zielińska and Potkański (2001), Gąsior (2002). The fresh silage samples were homogenized in a manual blender (Bosch), in an ice bath (for 2min), pouring in five times more water than the weight of the given sample. The homogenate was filtered by straining through miller gauze; the filtrate was passed through a soft filter (Filtrak No. 388), deproteinised with 24% (w/v) metaphosphoric acid (FLUKA) and centrifuged (7min., $10000\times g$ at 4°C) in an MPW-350R centrifuge. The supernatant was filtered (0.22-µm PTFE syringe filter 30-SF-02 CHROMACOL LTD) and analysed by a SHIMADZU HPLC system, RP, column: METACARB 67H (ORGANIC ACIDS COLUMN, Varian), mobile phase: 0.002M (v/v) sulphuric acid solution (95%, Sigma-Aldrich) in deionised water, flow rate $1\text{cm}^3/\text{min}$, loop 20 l, detector SDP-20A UV/Vis - 210nm). The external-standard method was employed using the FLUKA lactic acid standard and the SUPELCO standards of acetic, propionic and butyric acids. A mixture of standards was prepared: lactic acid $3\text{mg}/\text{cm}^3$, acetic acid $0.5\text{mg}/\text{cm}^3$, propionic acid $0.495\text{mg}/\text{cm}^3$, isobutyric acid $0.5\text{mg}/\text{cm}^3$, butyric acid $0.482\text{mg}/\text{cm}^3$, isovaleric acid $0.463\text{mg}/\text{cm}^3$ and valeric acid $0.469\text{mg}/\text{cm}^3$. The peak areas from

the sample were compared with the peak areas from the standards.

The amounts of biogenic amines were determined by high-performance liquid chromatography using the Shimadzu HPLC system according to Joosten and Olieman (1985), Gąsior and Brzóska (1999). The extraction of the amines: 50g ground silage sample (robot coupe® Blixer® 3) was homogenized in a manual blender (Bosch), in an ice bath and 250.0cm³ distilled water (for 2min.). A portion of the filtrate (5cm³) of this suspension was mixed with 0.5cm³ 55% (w/v) of trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged for 10min at 10 000x g and 4°C. After centrifuging the supernatant was filtered (0.22-µm PTFE syringe filter 30-SF-02 CHROMACOL LTD). High-performance liquid chromatography (HPLC) Shimadzu system (RP) with a Nucleosil-C18 250/4 column, post-column derivatization with ninhydrin at the temperature of 145°C, the phase of the carrier on the basis of DMSO, UV-VIS detector 546nm, and the patterns of biogenic amines SIGMA (Joosten and Olieman, 1986; Gąsior and Brzóska, 1999).

All the silage samples were air-dried, ground to pass a 1 mm screen and homogenized. The direct competitive ELISA was used for mycotoxin analysis. The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The competitive assay format, in which the toxin competes with the enzyme conjugated to the toxin for specific immobilized antibodies, is often used in commercial available kits (Ridascreen, Aflatoxin Cup, etc.). Bound enzyme conjugate converts the substrate into a colored, fluorescent or chemiluminescent active product (Gheorghe *et al.*, 2008).

The contamination with total aflatoxins (AFL), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) and T-2 toxin/HT-2 toxin was tested. The Veratox test kits (Neogen Corporation, Scotland), approved by the AOAC Research Institute (Certificate No. 950702), were used for the analysis. The extraction of samples was carried out in distilled water for DON and in methanol:water (70:30 v/v) for AFL, ZEN. To ensure the accuracy of subsequent testing, excessively acidic samples were adjusted with 1N NaOH (sodium hydroxide) to 6.5-7.5. The extracts were filtered through Neogen filter syringes and a Whatman #1 filter. The tests were performed according to the manufacturer's instructions. The results were obtained by

measuring absorbance and were determined using the micro well strip reader (Neogen, USA) at 650nm and comparing the readings against a standard curve.

The statistical analyses were carried out using SPSS software (version 17.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive statistic and Independent-Student's t test were used to analyze the data, and the differences were considered significant at $P \leq 0.05$. Furthermore, Pearson correlation coefficient between silage fermentation quality parameters and the individual amine and mycotoxins contents were calculated.

RESULTS

The quality of the observed silage in both farm groups was found within the typical range for Lithuania throughout the years. Table 1 - corresponded to the value characteristics of the silage quality.

Different distribution of the amine concentrations was found between farms: 17.00% ($P \leq 0.05$) higher levels of TY were observed in silage samples from organic farms and HIS - 46.00% ($P \leq 0.05$), PUT - 9.80% ($P \leq 0.05$), CAD - 17.34% ($P \leq 0.05$) higher levels - in samples from conventional farms.

Aflatoxins (total) and zearalenone, T-2/HT-2 toxin concentrations were higher respectively 15.95% ($P \leq 0.05$) and 13.35% ($P \leq 0.05$), 1.80% ($P \leq 0.05$) in silage prepared in organic farms. Deoxynivalenol concentration was higher 42.4% ($P \leq 0.05$) in silage made in conventional farms.

Correlation coefficients between biogenic amines, mycotoxins and silage fermentative parameters are given in Table 2. The statistical evaluation of the data from our samples from both farm groups showed that many correlations between the quality of silage fermentation and the concentrations of amines and mycotoxins were significant at $P \leq 0.05$ or $P \leq 0.01$. Particularly significant, strong positive correlations were detected between the concentrations of tyramine, putrescine, cadaverine, and the concentration of ammonia-nitrogen (N), dry matter, crude proteins also with butyric acid. However, histamine concentration was not correlated with all chemical and

fermentation parameters. Significant, negative strong correlations - between the concentrations of AFL (total) and ZEN and the concentration of dry matter, pH values. Mycotoxins DON and

T-2/HT-2 concentrations strongly positive correlated with the ammonia-nitrogen (N) value and lactic acid concentration.

Table 1. Chemical composition (g/kg DM), content of fermentation products (g/kg DM), biogenic amines (mg/kg DM) and mycotoxins ($\mu\text{g/kg DM}$) in silage from conventional and organic farms

	Silage from conventional farms		Silage from organic farms	
	Mean $\pm$ SEM ¹	Min. - Max. ²	Mean $\pm$ SEM ¹	Min. - Max. ²
Dry matter (g/kg)	423.70 $\pm$ 30.34	272.00 - 604.00	364.10 $\pm$ 29.51	248.00 - 533.00
Crude proteins	223.00 $\pm$ 79.58	118.00 - 937.00	229.50 $\pm$ 81.56	116.00 - 958.00
Water soluble carbohydrates	44.00 $\pm$ 7.15	9.60 - 77.70	45.70 $\pm$ 10.40	0.00 - 94.20
NDF	492.50 $\pm$ 27.75	349.00 - 634.00	487.20 $\pm$ 19.79	401.00 - 552.00
ADF	339.80 $\pm$ 10.42	293.00 - 391.00	316.40 $\pm$ 10.84	269.00 - 381.00
pH	4.84 $\pm$ 0.14	4.10 - 5.50	4.88 $\pm$ 0.16	4.10 - 5.50
NH ₃ /N	66.81 $\pm$ 23.47	9.34 - 93.75	91.67 $\pm$ 45.77	19.04 - 247.94
Lactic acid	66.00 $\pm$ 13.39	18.28 - 136.02	57.88 $\pm$ 10.07	6.7 - 109.79
Formic acid	0.03 $\pm$ 0.01	0.00 - 0.11	4.26 $\pm$ 4.24	0.00 - 21.24
Acetic acid	9.98 $\pm$ 2.99	0.00 - 30.82	15.27 $\pm$ 6.24	1.70 - 64.10
Propionic acid	1.24 $\pm$ 0.31	0.08 - 2.80	1.34 $\pm$ 0.30	0.47 - 3.16
Butyric acid	6.14 $\pm$ 0.93	2.71 - 12.28	4.98 $\pm$ 0.90	0.00 - 8.10
Ethanol	2.13 $\pm$ 1.98	0.00 - 10.45	2.97 $\pm$ 1.98	0.00 - 19.83
Histamine	12.36 $\pm$ 6.57	0.06 - 69.64	6.65 $\pm$ 2.23	0.00 - 22.62
Tyramine	98.26 $\pm$ 21.83	4.10 - 220.69	119.56 $\pm$ 49.78	6.30 - 512.50
Putrescine	123.62 $\pm$ 35.11	13.81 - 336.59	111.51 $\pm$ 46.00	0.00 - 465.88
Cadaverine	1722.52 $\pm$ 04.20	33.30 - 4787.24	1422.99 $\pm$ 696.87	32.54 - 6636.96
AFL (total)	27.35 $\pm$ 6.79	0.00 - 65.00	32.54 $\pm$ 7.36	0.00 - 70.00
ZEN	338.80 $\pm$ 41.72	135.00 - 520.00	391.00 $\pm$ 18.97	275.00 - 480.00
DON	327.50 $\pm$ 45.83	125.00 - 625.00	188.60 $\pm$ 34.03	16.00 - 300.00
T-2/HT-2	110.30 $\pm$ 11.87	82.00 - 178.00	112.30 $\pm$ 13.47	59.00 - 193.00

¹SEM – standard error of mean;

²Min-Max – minimum-maximum value

Table 2. Correlation coefficient between silage biogenic amine, mycotoxins contents and fermentation parameters in all samples from both farm groups

Parameter	DM (g/kg)	pH	NH ₃ /kgN	Lactic acid (g/kg)	Formic acid (g/kg)	Acetic acid (g/kg)	Propionic acid (g/kg)	Isobutyric acid (g/kg)	Butyric acid (g/kg)	Isovaleric acid (g/kg)	Valeric acid (g/kg)	Ethanol (g/kg)	Crude proteins (g/kg)
Histamine	0.18	0.08	0.003	-0.25	-0.04	0.07	0.05	-0.02	-0.07	-0.15	-0.13	0.15	-0.03
Tyramine	-0.54*	0.09	0.80**	-0.29	-0.20	-0.19	0.06	0.01	0.44	0.23	-0.14	-0.23	0.51*
Putrescine	-0.34	0.26	0.67**	-0.33	0.02	-0.02	0.07	0.07	0.40	0.40	-0.13	0.24	0.64**
Cadaverine	-0.41	0.19	0.67**	-0.25	-0.19	-0.14	0.02	-0.06	0.48*	0.18	-0.09	-0.25	0.58**
AFL (total)	-0.47*	-0.89**	-0.26	0.42	-0.19	-0.35	0.16	-0.16	0.25	0.60**	-0.21	-0.39	-0.28
ZEN	-0.51*	-0.48*	0.3	0.02	-0.06	-0.18	0.01	0.03	0.08	0.46*	-0.16	-0.32	-0.2
DON	0.35	-0.03	0.41	0.41	0.05	0.15	0.43	-0.22	0.003	0.04	0.20	-0.04	-0.19
T-2/HT-2	-0.37	-0.24	0.42	0.41	-0.21	-0.27	0.34	-0.06	0.07	0.65**	-0.18	-0.22	-0.4

*P $\leq$ 0.05; **P $\leq$ 0.01.

DISCUSSION

Forage crop composition has a major influence on silage fermentation. The most important components are dry-matter content, sugar content and buffering capacity (Piltz and Kaiser, 2004; Wyss, 2013). The samples of silage from organic and conventional farms were collected from different localities in Lithuania, so the weather conditions such as the air temperature, precipitation, plant maturity, differences between organic and conventional fertilization, and soil quality could have influenced the quality and dry matter content of the silage. The content of mean

crude proteins from the organic silage was 2.80% (P $\leq$ 0.05) higher than in conventional silage. Likewise, in a Belgian study, CP content in organic farms was high despite the low N-fertilizer input (Vliegher *et al.*, 2008). Determined pH values of silage showed a slight increase of 0.82% (P $\geq$ 0.05) in the silage samples from organic farms. Among the volatile fatty acids (VFA) the lactic acid was dominant. In the present study, lactic acid was the dominant fermentation product followed by acetic acid and with smaller amounts of other VFA and ethanol in both farm groups. The content of lactic acid was 12.00% higher (P $\geq$ 0.05) in silage samples

from conventional farms, while acetic acid content was 34.64% ($P \geq 0.05$) higher in the samples from organic farms. These differences could have been influenced by different DM counts, WSC, or the storage under a disruption of anaerobic conditions. Furthermore, heterofermentative lactic acid bacteria result in high levels of acetic acid (Danner et al., 2003).

Butyric acid is usually produced by *Clostridium* spp. as a result of contamination by soil or slurry (Danner et al., 2003). The products of this fermentation contribute to a reduction in the silage intake (Purwin et al., 2006). In our study butyric acid was detected in all silage samples from organic and conventional farms respectively 4.98 ± 0.90 g/kg and 6.14 ± 0.93 g/kg. Ethanol concentration as an indicator of excessive metabolism by yeasts in the silage was detected in 40% of samples from organic farms and 60% from conventional farms, the average concentration was 2.97 g/kg in organic farms and 2.13 g/kg in conventional farms. The content of $\text{NH}_3\text{-N}$ (ammonia nitrogen) was 27.12% ($P \geq 0.05$) higher in the samples from organic farms. A higher ammonium-nitrogen content (>12 to 15% of CP) indicates that crude protein in the grass was degraded by undesirable microorganisms during fermentation (Downing et al., 2008). Apart from this, the silage wrapped too loosely, filled too slowly, or the delay between baling and wrapping increase the risk of high ammonia concentrations. Furthermore, clostridia not only form butyric acid but are also responsible for the degradation of proteins to ammonia (Danner et al., 2003). Purwini et al., 2009 observed that ammonium nitrogen content was higher in silage with a higher moisture content. There is not much data in literature regarding the presence of biogenic amines in silage, especially when prepared in organic farms. Biogenic amines (BA) are produced by amino acid decarboxylation due to the enzymes of several lactic acid bacteria and the species of many genera potentially present in silage such as *Clostridia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, and *Pseudomonas*. The presence of BA is linked with a decrease in nutrition value and negative effects on animal health (Dunière et al., 2013). Lingaas and Tveit (1992) observed that feeding 100 g of putrescine a day through silage caused anorexia in some cows and not only influenced the rate of feed intake but decreased milk yield markedly. In the present study, a higher putrescine content was

found – 123.62 mg/kg (i.e. mean daily intake of putrescine by an animal given 20 kg of silage is 2.472 g) in silage produced in conventional farms. Feeding grass silage supplemented with very high level 7.2 g amines/kg DM (2.8, 1.4, 1.8 and 1.2 g of TY, CAD, PUT and HI, respectively), VanOs et al. (1997) observed that in sheep non-adapted to dietary amines acutely decreased DM intake due to reduced palatability. In the present study, the level of amines was lower in both farms groups – 1.6 g amines/kg in organic farms and 1.96 g amines/kg in conventional farms.

The type of raw materials and environmental conditions determine the composition of epiphytic microflora on the surface of the vegetative parts of green plants, thus affecting the final microbiological quality of silage (Purwin et al., 2006). Mycotoxins are quality-impairing toxic substances found in silage. They are produced by *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. fungi and can be harmful to human and animal health even in very low concentrations (Barug et al., 2004). Recommendations for maximum levels of mycotoxins in feeds and ingredients of dairy ruminants in Europe (aflatoxins have legislated maximum tolerated levels in Europe) are AFLB₁ – 0.005 (mg/kg), ZEN – 0.5 (mg/kg), DON and T-2/HT-2 – no guidance (Tangni et al., 2013). The above analysed mycotoxins were found in all silage samples from both farming systems, but they did not exceed the recommended norm. Aflatoxins (total) and zearalenone, T-2/HT-2 concentrations were higher in silage prepared in organic farms. Deoxynivalenol concentration was higher in the silage made in conventional farms. In a German study, no significant differences were found in DON concentrations in cereal samples from organic and integrated farming systems (Mäder, 2007). In literature, not much data can be found about the presence of mycotoxins in the silage prepared in organic farms. The highest mean levels of mycotoxins: AFL (total) – 21.2 ± 3.9 µg/kg, DON – 471.0 ± 65.6 µg/kg, ZEN – 397.5 ± 83.5 µg/kg were detected in ryegrass silage from bales prepared in Lithuanian conventional farms during years 2008 and 2009 (Baliukoniene et al., 2012). In 2007, mycotoxins contamination in grass silage in the United Kingdom was 11.9 µg/kg of T-2 and 61.8 µg/kg of ZEN toxins. Despite the small population size, these results support the idea

that screening is of extreme importance in management due to risk of mycotoxins (Aragon *et al.*, 2011).

A decrease in the amount of protein nitrogen during ensiling is accompanied by an increase in the content of proteolysis products, i.e. free amino acids and ammonia, as well as by the formation of biogenic amines in silage. The level of amines is negatively correlated with the rate of pH reduction during ensilage, and with DM intake (Steidlova and Kalač 2004, Purwini *et al.*, 2010). Van Os *et al.* (1996) reported significant correlations between the concentration of total and individual content with putrescine, cadaverine and tyramine and the ammonia or acetic acid. Formation of biogenic amines in silage is related to protein degradation. In the current study, strong significant correlations were found between tyramine, putrescine, cadaverine and ammonia ($P < 0.05$), CP ($P < 0.05$) and butyric acid ($P > 0.05$). In 2004, Steidlova *et al.* reported positive correlations between the contents of putrescine and cadaverine and the contents of α -amino group and ammonia, which seem to be plausible. The Estonian researcher Olt with coworkers (2005) studied the effect of additives on the content of biogenic amines in silage. The amount of biogenic amines was very low or they were not present in wilted silages, the dry matter content of its fresh material was 310g/kg. All biogenic amines under investigation were present in low dry matter silages without additives. Histamine had the highest and putrescine somewhat lower concentration: 5.24g/kg and 0.86g/kg, respectively.

Comparing the results of our investigation to those of the Estonian researchers, a strong negative correlation between tyramine, putrescine, cadaverine, and dry matter can be seen. Fermentation pattern may affect the growth of moulds and mycotoxin contamination in silages. Lactic acid and acetic acid have a limited effect on mould growth, whereas propionic acid and butyric acid seem to be more efficient than mould inhibitors (Cheli *et al.*, 2013). In the present study, lactic acid has strong correlations ($P \geq 0.05$) with AFL (total), DON and T-2/HT-2 and butyric acid has strong correlation ($P \geq 0.05$) with DON. Dry matter parameters showed strong negative ($P \leq 0.05$) correlations with mycotoxins. PH showed strong negative ($P \leq 0.05$) correlations with AFL (total) and ZEN. In the

study by Boudra and Morgavi (2008) it was shown that some mycotoxins can be partially detoxified by the activity of silage fermentative bacteria. The disappearance of mycotoxins was significantly higher at a lower dry matter (280 vs. 420g kg⁻¹) and at prolonged storage (3 vs. 6 months), while the effect of temperatures, 15 or 30°C, was insignificant (Kalač, 2011). The level of undissociated organic acid (pH dependent) could influence the growth of mold due to the greater capacity to penetrate cell structures. The incidence of toxin metabolism under low pH conditions during the storage period and the toxin burden of mature silages depend on the pH sensitivity of different toxins (Cheli *et al.*, 2013). The growth conditions for a specific fungal species and toxin production might differ in the field when compared with the post-harvest stages, where changes in temperature, moisture, water activity (a_w) and relative humidity occur. Fungi normally grow between 10 and 40°C, over a pH range of 4-8 and at a_w level above 0.70. However, it is well known that most fungi can grow in a range of conditions; furthermore, the growth on suitable substrates is not necessary for mycotoxin formation (Magan *et al.*, 2003; Reyneri, 2006; Cheli *et al.*, 2013).

CONCLUSIONS

Our results suggest that there are no relevant differences between organic and conventional farming systems in terms of the higher risk of contaminations of biogenic amines and mycotoxins. The results demonstrate that the concentrations of cadaverine, putrescine, and histamine were highest respectively 17.44% ($P \leq 0.05$), 9.80% ($P \leq 0.05$) and 46.29% ($P \leq 0.01$) in the silage from conventional farms. 100% of silage samples from organic and conventional farms contained mycotoxins (AFL (total), ZEN, DON, T-2/HT-2). In the silage from organic farms, AFL (total), ZON and T-2/HT-2 content, respectively, were higher 15.95% ($P \leq 0.01$), 13.35% ($P \leq 0.01$) and 1.8% ($P \leq 0.05$) than in the silage from conventional farms. DON content was 42.4% ($P \leq 0.01$) higher in silage from conventional farms. These differences might be due to a difference in dry matter content and plant maturity between the organic and conventional silage samples. Strong negative correlations between silage fermentation quality and the concentrations of amines were detected between the concentrations of tyramine,

putrescine, cadaverine, and the concentration of ammonia-nitrogen (N), CP, butyric and strong negative correlations with DM content. Mycotoxins have strong negative correlation with DM and AFL, ZEN have strong positive correlation with pH, and DON or T-2/HT-2 - with ammonium and lactic acid. Combined effects of biogenic amines and mycotoxins are considered to limit palatability of poorly preserved silages or to be a bad influence on livestock health. Further research is required to determine the biggest count of organic grass silage samples made in the different harvesting systems.

REFERENCES

- ARAGON, Y.A.; RODRIGUES, I.; HOFSTETTER, U.; BINDER, E.M. Mycotoxins in silage: occurrence and prevention. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.*, v.1, p.1-10, 2011.
- BALIUKONIENE, V.; BAKUTIS, B.; VAIVAODAITĖ, T. et al. Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. *Vet. Med. Zootec.*, v.59, p.3-9, 2012.
- BARDÓCZ, S.; DUGUID, T.J.; BROWN, D.S. et al. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br. J. Nutr.*, v.73, p.819-828, 1995.
- BARUG, D.; VAN EGMOND, H.; LOPEZ-GARCIA, R. et al. *Meeting the mycotoxin menace*. [Noordwijk]: Wageningen Academic, 2004. 319p.
- BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Reduction in Fusarium toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time. *J. Agric. Food Chem.*, v.56, p.4523-4528, 2008.
- BRYDEN, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.173, p.134-158, 2012.
- CHELI, F.; CAMPAGNOLIB, A.; DELL'ORTO, V. Fungal populations and mycotoxins in silages: from occurrence to analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* v.183, p.1-16, 2013.
- DABBERT, S.; STOLZE, M.; PIORR, A.; HÄRING, A. The environmental impacts of organic farming in Europe. *Org. Farming Eur. Econ. Policy.* v.6, p.1-96, 2000.
- DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p.562-567, 2003.
- DOWNING, T.W.; BUYSERIE, A.; GAMROTH, M.; FRENCH, P. Effect of water soluble carbohydrates on fermentation characteristics of ensiled perennial ryegrass. *Prof. Anim. Sci.*, v.24, p.35-39, 2008.
- DUNIÈRE, L.; SINDOU, J.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et al. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.182, p.1-15, 2013.
- FINK-GREMMELS J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet. J.*, v.176, p.84-92, 2008.
- FUSI, E.; ROSSI, L.; REBUCCI, R. et al. Administration of biogenic amines to saanen kids: effects on growth performance, meat quality and gut histology. *Small Ruminant Res.*, v.53, p.1-7, 2004.
- GAŚSIOR, R. *Oznaczanie lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego w kiszonkach i treści żywca*. Balice, Kraków: Instytut Zootechniki, 2002.
- GAŚSIOR, R.; BRZÓSKA, F. The type and level of biogenic amines in alfalfa and red clover silage. *Zesz. Nauk. Akad. Rolniczej Krakowie*, v.347, p.89-94, 1999.
- GHEORGHE, A.; JECU, L.; VOICU, A.; POPEA, F.; ROSU, A.; ROSEANU, A. Biological control of phytopathogen microorganisms with antagonist bacteria. *Chem. Engineering Transactions*, v.14, p.509-516 2008.
- HARRISON, J.H.; BLAUWIEKEL, R.; STOKES, M.R. Utilization of grass silage. Fermentation and utilization of grass silage. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.3209-3235, 1994.
- JOOSTEN, H.M.L.L.; OLIEMAN, C. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by HPLC in combination with thermo sensitized reaction. *J. Chromatogr.*, v.356, p.311-319, 1986.
- KALAČ P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. *Food Chem.*, v.125, p.307-317, 2011.
- KOSTULAK-ZIELIŃSKA, M.; POTKAŃSKI, A. Quality of baled grass-clover silages ensiled with chemical additives. Chemical composition. *Ann. Anim. Sci.*, v.1, p.153-165, 2001.
- LINGAAS, F.; TVEIT, B. Etiology of acetoneemia in Norwegian cattle. Effect of butyric acid, and putrescine. *J. Dairy Sci.*, v.75, p.2433-2439, 1992.
- MÄDER, P.; HAHN, D.; DUBOIS, D. et al. Wheat quality in organic and conventional farming: results of a 21 year field experiment. *J. Sci. Food Agric.*, v.87, p.1826-1835, 2007.

- MAGAN, N.; HOPE, R.; CAIRNS, V.; ALDRED, D. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Eur. J. Plant Pathol.*, v.109, p.723-730, 2003.
- MANSFIELD, M.A.; KULDAU, G.A. Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia*, v.99, p.269-78, 2007.
- O'BRIEN, M.; O'KIELY, P.; FORRISTAL, P.D.; FULLER, H.T. Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish midlands. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.247, p.131-135, 2005.
- O'BRIEN, M.; NIELSEN, K.F.; O'KIELY, P. *et al. J. Agric. Food Chem.*, v.54, p.9268-9276, 2006.
- OFFICIAL Methods of Analysis. 18.ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005.
- OLT, A.; KÄRT, O.; KALDMÄE, H. *et al.* The effect of additive and dry matter content of silage protein degradability and biogenic amine content. Estonian; University Life Science, 2005. p.177-123. Available in: <http://agrt.emu.ee/pdf/2005_2_olt_i.pdf>. Accessed in: 25th November 2016
- PHUNTOSOK, T.; FROETSCHER, M.A.; AMOS, H.E. *et al.* Biogenic amines in silage, apparent post-ruminal passage, and the relationship between biogenic amines and digestive function and intake by steers. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.2193-2203, 1998.
- PILZ, J.W.; KAISER, A.G. Principles of silage preservation. In: KAISER, A.G.; PILZ, J.W.; BURNS H.M.; GRIFFITHS N.W. (Eds.). *Successful silage*. 2.ed. Orange: Dairy Australia and NSW Department of Primary industries, 2004. p.25-59.
- PURWIN, C.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł.; WARMIŃSKA-RADYKO, I.; TYWOŃCZUK, J. Jakość kiszzonek: aspekty mikrobiologiczne, zdrowotne i produkcyjne. *Med. Wet.*, v.62, p.865-869, 2006.
- PURWIN, C.; PYSERA, B.; SEDEREVIČIUS, A. Effect of silage made from different plant raw materials with the addition of a fermentation inhibitor on the production results of dairy cows. *Vet. Zootec.*, v.51, p.44-51, 2010.
- PURWIN, C.; PYSERA, B.; TOKARCZYK, M. Production results of dairy cows fed grass alfalfa silage with a different degree of wilting. *Vet. Zootec.*, v.46, p.60-66, 2009.
- REYNERI, A. The role of climatic condition on micotoxin production in cereal. *Vet. Res. Commun.*, v.30, Suppl.1, p.87-92, 2006.
- SEUFERT, V.; RAMANKUTTY, N.; FOLEY, J.A. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. *Nature*, v.485, p.229-232, 2012.
- STEIDLOVA, Š.; KALAČ, P. The effects of lactic acid bacteria inoculants and formic acid on the formation of biogenic amines in grass silages. *Arch. Anim. Nutr.*, v.58, p.245-254, 2004.
- STORM, I.M.L.D.; SØRENSEN, J.L.; RASMUSSEN, R.R. *et al.* Mycotoxins in silage. Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *Stewart Postharvest Rev.*, v.4, p.1-12, 2008.
- TAMM, L.; THÜRIG, B. Mycotoxins and pathogens in organic food. *Org. Stand.*, v.15, p.12-13, 2002.
- TANGNI, E.K.; PUSSEMIER, L.; VAN HOVE, F. Mycotoxin contaminating maize and grass silages for dairy cattle feeding: current state and challenges. *J. Anim. Sci. Adv.* v.3, p.492-511, 2013.
- TOMASI, L.; HORN, W.; RONCADA, P. *et al.* Recherches préliminaires sur la présence d'aflatoxine B1 dans les fourrages fanés de la province de Reggio Emilia (Italie). *Fourrages*, v.58, p.179-186, 1999.
- VROTNIAKIENĖ, V.; JATKAUSKAS, J. Growth and carcass traits of fattening bulls offered trench or big bale silages (in Lithuanian). *Anim. Husb.*, v.46, p.72-81, 2005.
- YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.*, v.51, p.81-99, 2002.

SUMMARY

Introduction

In Lithuania, livestock production and dairy farming are among the priority branches of agriculture oriented toward the internal and external markets whereas cattle breeding still remains the leading branch of animal husbandry. This is predetermined by favourable natural conditions and stockbreeding traditions. Production of livestock commodities occupies a very important place in the European agricultural sector. The good results of this activity depend on the use of high quality and safe animal feeding stuffs. The high level of human and animal safety is one of the main objectives of the EU regulation No 183/2005 [132].

In their regulations, the member states of the European Union lay down high safety provisions for animal feeding stuffs. The animal feeding stuffs must be free of biological, chemical or physical contaminants. In 2005, regulation on animal feeding stuffs hygiene (EU 183/2005) came into force. It is mandatory for all member states including Lithuania. Hygiene specifications ensuring hygienic quality of fodder also are applied to primary fodder production including ensiling of grass crops and other green plants. The good practice recommendations include control of mycotoxins, which may occur during the primary fodder production. These toxic compounds may be a serious hazard to human and animal health and entail economic losses in the internal and international markets [124, 132].

Grass is the main fodder for cattle. Lithuania has a good fodder base for cattle breeding. The cultural and natural pastures and meadows account for 14% of agricultural areas in use; 1.2 ha of meadows per cow on the average. In 2009, the stock of silage produced of feeding root crop, grasses, hay, and maize amounted to about 1.5 mln t what is sufficient for maintaining and increasing the stock of cattle [106]. In the age of modern technologies the number of industrial livestock production (factory farming) farms increases. In such farms, the animals are fed with mechanically processed fodder all year round [79]. Even ecologic farms could not do without conserved or otherwise mechanically processed fodder because the vegetation of grasses and other green fodder crops lasts in Lithuanian only for 5–5.5 months. Due to the seasonal character of vegetation the conservation of these crops for in-house cattle feeding, which lasts for 210 days, is inevitable. On the other hand, grass and other green crops grow very intensively in the spring and the beginning of the summer when it is impossible to feed the entire harvest to cattle. The excess of the crops must be conserved even during the season of intensive vegetation [80]. Ensiling is one of the oldest methods of forage

production. It is applied in order to avoid reproduction of harmful microorganisms including fungi.

Bearing in mind the bulk of usage and importance as a feedstuff the quality and safety control of silages is so far insufficient. In this country, the quality of produced grass crop forage has not been systematically scientifically investigated. The available scientific research data show that the quality of hay and silage usually is rather poor because of the neglect of technological requirements of forage production. Moreover, the raw material used for forage production often is not of the best quality. The available fragmentary investigation data are scarce for objective assessment of the actual situation. More attention should be paid to fodder quality and safety issues because animal feeding with low quality fodder reduces their productivity and poses hazard for human and animal health [84]. Animal health depends on many factors. The most important are housing conditions, attendance and fodder. Recently, under changing climate conditions, the spread and development of unwelcome microorganisms, including fungi, have intensified. Under favourable conditions or under “stress”, fungi are capable of producing toxic compounds (mycotoxins) hazardous for human and animal health [42, 46].

Even good practice preventive measures applied during harvesting and storage in order to avoid contamination with microorganisms cannot guarantee complete safety of forage [83].

The hygienic quality of raw material and silage has been so far little investigated in Lithuania. The data are lacking about the changes of mycotoxin concentrations in raw materials and at various stages of silage production using different ensiling technologies and farming systems. Moreover, the possible effects of maximum and medium concentrations of mycotoxins, determined in silages produced in Lithuania, on animal health have not been studied either. The negative impact of long-lasting feeding of animals with fodder contaminated even with small concentrations of mycotoxins on animal health status and productivity also is indefinite. Determining the correlations of these unwelcome compounds with chemical fermentation parameters would reveal the risks of their formation and enable to avoid their getting onto the feeding table.

The aim of the study:

The aim of this study was to investigate the hygienic quality of raw material and silage (grown and produced in Lithuania) and risk assessment for animal health.

Objectives of the study:

1. To determine and compare hygienic parameters and concentrations of mycotoxins in raw materials and silage at various stages of fermentation produced using different farming systems.
2. To find correlations between hygienic and chemico-fermentative parameters of silage.
3. To analyse the self-control concentrations of silage forage in 2011–2015 and concentrations in problem batches of silage delivered to the Animal Welfare Research Laboratory for mycotoxin analysis.
4. To evaluate the impact of various mycotoxins and silages contaminated with mycotoxins on different systems of the organisms using different tissue cultures *in vitro*.
5. To evaluate the impact of naturally mycotoxin-contaminated fodder on the milk cows *in vivo* and the efficacy of the preparation for detoxification.
6. To study the possibilities to use plant extracts for improvement of hygienic quality of silage.

Actuality and novelty of the work:

As was mentioned, so far Lithuania lacks investigations about the hygienic quality of silages and raw materials, i.e. about the concentrations of microorganisms, including fungi and secondary metabolites, in them. The *in vitro* and *in vivo* data about the impact of mycotoxins on animal health also are lacking. The present study is the first of this kind in Lithuania. Concentrations of mycotoxins in the samples of maize and silage at different fermentation stages collected from farms in different Lithuanian regions were determined. The present paper contains a survey of the distribution differences of the secondary metabolites of fungi in the round bales of perennial grass silage in the farms applying different farming systems. The changes of the hygienic quality of silage and concentrations of mycotoxins in the raw material and at different fermentation stages applying different ensiling technologies were determined. The study is especially relevant for evaluation of the quality and safety of fodder from organic farms because few works in this field of research have been carried out. Knowing at what stage of fermentation the greatest changes of silage quality (mycotoxin concentrations in particular) occur it would be possible to avoid their getting into the animal organism or at least to reduce the negative impact of mycotoxins using appropriate detoxification measures. The present study shows the ways of mycotoxins getting not only into the animal organism but also into the human organism through the food chain what helps to evaluate the

seriousness of the health risks. The obtained results will fill some gaps of the data necessary for establishment of the maximal concentration limits of mycotoxins in fodder.

The correlation links between the hygienic and fermentation parameters, which are important for analysis of hygienic changes and patterns of mycotoxins formation in the technological process from the moment of packing the raw material until the end of storage, were searched for. The use of medicinal extracts *in vitro* as a measure for stabilization of hygienic level was evaluated.

Material and methods of the study

Time and place of investigation. The scientific research work was conducted in 2011–2016.

In 2011–2013, the raw material (chopped whole crop maize (n = 20), mixture of perennial meadow grasses and leguminous grasses (n = 40) and silages produced of these plants (maize silage in trenches (n = 40); baled perennial meadow and leguminous grasses (n = 40)) were collected from Lithuanian farms with varying farming systems in different Lithuanian regions. The microbiological and mycotoxicological (DON, ZEA, T-2, OTA, AFB₁) tests were performed at the Animal Welfare Research Laboratory of the Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences (LUHS). Cytotoxicity and genotoxicity of DON, ZEA and AFB₁ were tested at the Institute of Biology Systems and Genetic Research, LUHS VA.

In February–March of 2012, the impact of mycotoxin-contaminated forage on cow health was evaluated in a dairy farm.

In 2013, volatile fatty acids, biogenic amines and ammonium nitrogen in ensiled forage were determined in the Faculty of Animal Bioengineering of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

In 2011–2015, concentrations of mycotoxins AFB₁, ZEA and DON in the samples of ensiled fodder, delivered from different Lithuanian farms for control tests or on suspicion of contamination of silage with mycotoxins (health disturbances of milk cows), were determined at the Animal Welfare Research Laboratory of the Veterinary Academy, LUHS.

In 2012–2015, the impact of plants extracts on the hygienic quality of ensiled fodder was determined. Analysis of the chemico-fermentative parameters of samples was performed at the Institute of Agriculture, affiliation of the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry. The thymol and carvacrol concentrations were determined at the Centre for Physical Sciences and Technology.

Sampling of raw material and silage. In 2011–2012, samples of chopped whole crop maize for ensiling were taken from 20 farms with usual farming system once before fermentation (end of October–beginning of November) and samples of silage from solos twice, i.e. in February–March (after 3 months of ensiling) and in June (after 8 months of ensiling). In 2012–2013, a mixture of perennial meadow (*Poaceae*) and leguminous (*Fabaceae*) grasses, predominated by *Poaceae*, was withered for up to 24 hours (depending on the environmental conditions) before baling. The samples of the first mowing (end of May–beginning of June) and baled silage (February–March) were taken from 20 certified organic farms and 20 farms with conventional farming system.

The ensiled fodder was produced without inoculants or other additives. Before sampling, the raw material and silage were evaluated by senses: colour, odour, absence or presence of mould. Only good quality samples without mould were taken. One combined sample amounted to 2–3 kg of raw material or silage composed of 8–10 smaller samples from different fodder storage places. A sample of 1–2 kg was prepared for laboratory tests. The samples were put into airtight bags from which the air was removed. After delivery to laboratory, the content of dry matter was determined and afterwards the samples were stored at 20 °C until further analysis.

In 2011–2015, ensiled fodder was delivered from different Lithuanian farms to the Animal Welfare Research Laboratory for regular control tests or on suspicion of contamination which might have caused outbreaks of non-infectious diseases. During this time, 106 samples were examined including 32 samples of whole crop maize silage, 40 samples of perennial grass silage, 15 samples of baled perennial grasses and 19 samples of corn maize silage. The samples were grouped according to the storage time (from production until delivery for tests): 1–2, 3 and more than 8 months after ensiling or baling. The maize or perennial grass silage is tested and used one month after filling. The samples of maize and perennial grass silage also were delivered for mycotoxin analysis after eight months of storage, i.e. at the beginning of pasturage.

The differences of mycotoxin concentrations after various storage durations and in different years were compared (correlated) with meteorological conditions during ensiling. The data on meteorological conditions were obtained from the Lithuanian hydrometeorological stations.

Microbiological composition of raw materials and silage was defined according standards:

Total count of aerobic bacteria (LST ISO 4833-1:2013). Mixture of perennial meadow grasses and leguminous grasses (n = 40) and silages produced of these plants (n = 40).

Total count of mesophilic lactic acid bacteria (LST ISO 15214:2009). Chopped raw maize (n = 20), maize silage (n = 40), mixture of perennial meadow grasses and leguminous grasses (n = 40) and silages produced of these plants (n = 40).

Clostridium perfringens (LST ISO 7937:2004). Chopped raw maize (n = 20), maize silage (n = 20), mixture of perennial meadow grasses and leguminous silages (n = 20)

Listeria monocytogenes (LST ISO 11290-2:2003/A1:2005). Chopped raw maize (n = 20), maize silage (n = 20), mixture of perennial meadow grasses and leguminous silages (n = 20).

Total count of yeast and fungi (LST ISO 21527-1:2008). Chopped raw maize (n = 20), maize silage (n = 40), mixture of perennial meadow grasses and leguminous grasses (n = 40) and silages produced of these plants (n = 40).

Identification of fungi, directly involved in mycotoxins biosynthesis, by PCR. The methods of dilution plating were applied for identification of fungi in samples of silage, before PCR method, were used microscopic examinations to identify the presence fungi until strains. DNA was extracted using Nucleospin Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany). PCR primers were designed from genes directly involved in mycotoxins biosynthesis, including trichotecene TRI5 (685 bp), TRI6 (131 bp), TRI7 (381–445 bp), TRI13 (282 bp), aflatoxins biosynthesis APA (1034 bp) OMT (1254 bp).

Analysis of mycotoxins. Concentrations of aflatoxin (total), zearalenone, DON, T-2, ochratoxin (A) were analyzed by thin layer chromatography method according to approved Romer labs. Inc (Austria) methodology (PUBLICATION I) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (PUBLICATION II and III).

The amount of biogenic amines were determined by high performance liquid chromatography using HPLC system (PUBLICATION I and II). Maize silage (n = 24), mixture of perennial meadow grasses silage (n = 20).

Chemico-fermentative evaluation of raw materials and silage. (PUBLICATION I, II and III).

In vitro evaluation of cytotoxicity induced by mycotoxins. Toxic effect of pure mycotoxins DON, ZEA, AFB₁ and their combinations (as naturally occur in real practice in Lithuanian feed), and toxic effect of 6

different silages samples contaminated with the mycotoxins was determined on these cell lines: BHL-21 – baby hamster kidney fibroblasts, HeLa – human cervix epitheloid carcinoma, RPAEC – rat primary pulmonary artery endothelial cells, MH-22A – mouse hepatocarcinoma. The viability of the cells (apoptosis) was estimated staining them with crystal violet. Metabolic activity of viable cell (proliferation) was estimated with MTT method. The cytotoxicity of samples was assessed by comparing data of the experimental specimens to untreated cells – the IC₅₀ value (50% response compared to untreated cells).

Genotoxic effects of mycotoxins in bovine lymphocytes. We investigated genotoxic effects of mycotoxins DON, ZEA, AFB₁ and DON/ZEA combinations (as naturally occur in real practice in Lithuanian feed) in vitro cultures of bovine lymphocytes. We determined chromosome aberrations following mycotoxins treatment. Peripheral blood was drawn from the jugular vein of three clinically healthy cows, using heparinized vacutainers. Lymphocytes were separated and one mililiter was cultured in 9 ml of RPMI-1640 medium (with 10 µg/ml L-glutamine, NaHCO₃) (Sigma, USA). Bovine peripheral lymphocytes were cultured for 72 h, 38 °C for chromosome aberrations analysis. Mycotoxins were added immediately after mitogen stimulation. After 70 h of incubation was added 0.02 ml colchicine (Sigma, USA) for 10 ml cultures and left during last 2 h of cell growth. Harvested cells were collected and slides prepared for chromosome aberrations (chromosome breaks, chromatid breaks, fragments, gaps). From each mycotoxins 50 – well spread metaphases were counted.

The evaluation of toxic effects of a diet naturally contaminated with mycotoxins on dairy cows health, performance and determine anti-mycotoxin additive effect (PUBLICATION I)

Employment of plants extracts as a preventive measure for maintaining hygienic quality of silage

Laboratory trials were performed:

For trials were used: *Thymi herba* and *Origani herba* (country of origin: Lithuania; manufactured by “Švenčionių vaistažolės”).

Production of vegetal extracts using solutions with different polarities. The extracts were produced by maceration using water and ethanol as solvents and following Handa et al. and Tayel et al. techniques [74, 161]. The desiccated plants were chopped. 25 g and 50 g of chopped plant mass were mixed with 200 ml of distilled water and 70% ethyl alcohol, covered and stored for 24 hours at room temperature avoiding direct solar radiation.

After 24 hours, the solution was filtered using filter Whatman No 1. The obtained extract was at once added to the ensiled maize.

Before the addition into the ensiled maize mass, the extracts were diluted (following the NCCLS standard) to obtain the minimal inhibitory concentration. Dilution was used for the *Thymi herba* and *Origani herba* extracts inhibitory concentration that prevents growth of the most widespread fungi in silages *A. fumigatus* and *A. niger*.

100 µl of the water extracts of *Thymi herba* and *Origani herba* (50.0 g of chopped plant mass mixed with 200 ml of distilled water) and ethanol extracts (50 g of chopped plant mass mixed with 70 ethyl alcohol) each were mixed with 100 µl of microorganism suspension in sterile 24 wells of µ-plate. Sterile distilled water + microorganisms were used for control. The microorganism suspensions were prepared keeping to MacFarland optical density standard. The suspensions were stored for 24 hours at 30 °C. After that, they were poured into sterile Petri dishes, covered with culture medium and incubated for 72 hours at 26 °C. After this procedure, the number of fungi colonies was counted.

Maize was chosen as the raw material for silage. The harvested and chopped maize mass was ensiled in 3 L mini-silos: 20 ml of vegetal extracts and 1 kg of raw material (for each extract separately) were well mixed and compressed into the mini-silos.

Preparation of plant extracts:

R-VE-50 – 20 ml water extract of *Thymi herba* (50 g of *Thymi herba* and 200 ml of distilled water); R-VE-25 – 20 ml water extract of *Thymi herba* (25 g of *Thymi herba* and 200 ml of distilled water); R-EE-50 – 20 ml ethanol extract of *Thymi herba* (50 g *Thymi herba* and 200 ml 70% ethyl alcohol); R-EE-25 – 20 ml ethanol extract of *Thymi herba* (25 g of *Thymi herba* and 200 ml 70% of ethyl alcohol); C-VE-50 – 20 ml water extract of *Origani herba* (50 g of *Origani herba* and 200 ml of distilled water); C-VE-25 – 20 ml water extract of *Origani herba* (25 g of *Origani herba* and 200 ml of distilled water); C-EE-50 – 20 ml ethanol extract of *Origani herba* (50 g of *Origani herba* and 200 ml of 70% ethyl alcohol); C-EE-25 – 20 ml ethanol extract of *Origani herba* (25 g of *Origani herba* and 200 ml of 70% ethyl alcohol); KV – 20 ml control with distilled water; KS – 20 ml control with ethyl alcohol (70%).

Silage was produced with two commercial additives (silage inoculants) used separately. The additives contained the following bacteria: additive I (KG) – *L. plantarum*, *E. faecium*, *P. acidilactici* and additive II (KC) – *L. plantarum*, *P. acidilactici*, and xylanase. The same principle was used for production of the control silage (K) without additives. For each extract and control, two mini-silos were made. The silos were hermetically closed and

stored for 90 days at 20 °C. The ensiling under laboratory conditions was conducted based on modified Tayel et al and Jatkauskas et al. methods. After opening the silos, samples were taken (n = 26) for chemical analysis, fermentation parameters, microbiological status and mycotoxin concentrations using the methods given in Chapters 2.3–2.5.

The statistical analyses were carried out using „IBM SPSS Statistics“ software (version 22.0) and „Microsoft Excel 2010“. Arithmetic means ($\bar{X}$), standard errors of means (SE), standard deviation (SD). Descriptive statistic and Independent-Student's t test were used to analyze the data, and the differences were considered significant at $P < 0.05$. Furthermore, Pearson correlation coefficient between silage fermentation quality parameters and the individual amine and mycotoxins contents were calculated.

Results

Hygienic quality and contamination with fungi, mycotoxins and biogenic amines of maize raw material and silage at different times after storage

Chemical and fermentation parameters of the tested raw material and silages are given in PUBLICATION II, Table 1.

The highest statistically significant concentration of lactic acid bacteria in silage was determined 8 months after storage. Eight months after storage, the number of fungi colonies decreased by 17.49% ($p < 0.05$) but the number of yeasts increased by 42.27% ($p < 0.05$).

In raw maize, *L. monocytogenes* accounted for the highest percentage of the undesirable microflora. During the present study, *L. monocytogenes* was isolated in 25% of raw maize samples before fermentation and in 15% of silage samples 3 months after storage. Eight months after storage, these undesirable microorganisms in maize silage were absent. Potential of moisture in the raw mass containing *L. monocytogenes* before fermentation was pH 4.80–5.92. In the silage samples with *L. monocytogenes*, the value was pH 3.48–4.87.

C. perfringens was detected in 2% of raw mass with pH ranging from 4.55 to 6.04 and in 2% of silage samples 8 months after storage with pH 4.30.

Fourteen genera of filamentous fungi were found in raw maize and in maize silage. The concentration of *Fusarium* spp. was statistically significantly higher ($p < 0.05$) in raw maize than in silage three months after storage. The following species of *Fusarium* spp. were dominant: *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. culmorum*. Eight months after storage, fungi of this genus in silage were

absent. Six species of *Aspergillus* including *A. niger* were isolated and identified. *A. niger* was dominant in silage samples three months after storage ($p<0.05$). Eight months after storage, the concentration of *A. fumigatus* ($p<0.05$) was highest compared to the value determined in the raw mass. Three months after storage, the samples of silage were most heavily contaminated with *Penicillium* spp. The following species of *Penicillium* fungi were dominant: *P. verrucosum*, *P. roqueforti*, *P. griseofulvum*.

Mycotoxins ZEA and DON were identified in all samples of maize silage. DON in raw mass was detected in 95% of samples. The highest average DON concentration (2600 $\mu\text{g/kg}$) was determined 3 months after storage, i.e. by 58.54% higher than in the raw mass ($p<0.05$). The lowest average DON concentration (610 $\mu\text{g/kg}$) was established in silage samples 8 months after storage, i.e. by 62.80% lower ($p<0.05$) than in the raw mass and by 76.54% lower ($p<0.05$) than 3 months after storage.

The highest average ZEA concentration (880 $\mu\text{g/kg}$) was established 3 months after storage, i.e. by 3.7 times higher ($p<0.05$) than in the raw mass. Eight months after storage, it was higher than in the raw mass by 1.6 times ($p<0.05$).

The T-2/HT-2 highest average concentration (147.25 $\mu\text{g/kg}$) of mycotoxins was 8 months after storage, i.e. by 3.7 times higher ($p<0.05$) than in the raw mass. Three months after storage, it exceeded the value of raw mass by 3.5 times ($p<0.05$).

The lowest average AF concentration (0.94 $\mu\text{g/kg}$) was in raw mass whereas the highest one in silage 8 months after storage. The highest average OTA concentration (29.15 $\mu\text{g/kg}$) was 3 months after storage. It exceeded the concentration found 8 months after storage by 53% ($p<0.05$).

Gliotoxin was found in 70% of samples. Irradiance of other colours was observed during analysis presumably indicative of the presence of other toxins (like fumigaclavine or fumitremorgin) as well. Unfortunately, without the necessary standards they could not be evaluated.

Hygienic quality and contamination with fungi, mycotoxins and biogenic amines of perennial grasses and baled silages from organic farms and farms with conventional farming systems

Chemical and fermentation parameters of raw masses and silages are given in PUBLICATION III, Table 1.

The number of fungi colonies contaminating the raw material from organic farms amounted to 4.27 log cfu/g ($p>0.05$) and was by 7.82% higher than in perennial grass samples collected from the farms with conventional farming system. The total number of microorganisms was by 2.92%

($p>0.05$) higher in the samples taken from organic farms. The concentrations of lactic acid bacteria and yeasts were higher in farms with conventional farming system by 16% ($p<0.05$) and 44.23% ($p>0.05$) respectively. The total number of microorganisms and the number of lactic acid bacteria in baled silage were by 4.55% ($p>0.05$) and 11.68% ($p<0.05$) higher in the samples from organic farms. The number of fungi colonies in silage from both types of farms differed marginally. The number of yeasts was by 57.98% ($p>0.05$) higher in silage samples from farms with conventional farming system.

L. monocytogenes were identified in 15% of silage samples from farms with conventional farming system and in 5% of samples from organic farms. *Clostridium* spp. was identified in 25% of silage samples from organic farms and in 15% of samples from farms with conventional farming system. *C. perfringens* was identified in 5% of samples from each kind of farms.

The samples of perennial *Poaceae* and *Fabaceae* grasses from both types of farms were predominated by *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* and other genera of fungi. The following possibly toxic species of *Fusarium* were dominated: *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *Aspergillus* rūšys: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Penicillium* genus: *P. verrucosum*, *P. commune*, *P. roqueforte* and other.

The samples of grass masses were mainly predominated by *Alternaria*, *Cladosporium* and *Fusarium* genera of fungi. Comparison of raw mass contamination with possibly toxicogenic fungi showed their higher concentrations in the samples from organic farms: *Fusarium* spp. by 4.44% ($p>0.05$), *Alternaria* spp. by 20.48% ($p>0.05$) and *Aspergillus* spp. by 5.75% ($p>0.05$). Silage samples from organic farms also contained higher concentrations of possibly toxicogenic fungi: *Penicillium* spp. by 53% ($p>0.05$) and *Aspergillus* spp. by 53.23% ($p>0.05$).

The concentrations of fusariotoxins ZEA, DON and T-2/HT-2 in perennial grass samples and baled silages from organic farms and farms with conventional farming system varied.

The number of raw mass samples containing mycotoxin ZEA from conventional farms by 16.67% exceeded the number of samples from organic farms. The average concentration (361 $\mu\text{g/kg}$) of ZEA in them by 77.83% ($p>0.05$) exceeded the value determined for samples from organic farms. By 33.33% ($p<0.05$) higher concentration (215 $\mu\text{g/kg}$) of DON was established in samples from organic farms. The differences of AF (total) concentrations in samples from both types of farms were negligible ($p>0.05$).

The concentration (391 µg/kg) of ZEA in silage samples from organic farms was by 13.4% higher than in samples from conventional farms. The differences of T-2/HT-2 concentration between both types of farms were insignificant ($p>0.05$). The concentration (32.54 µg/kg) of AF (total) by 16% ($p>0.05$) was higher in the samples from organic farms. DON was detected in 100% of samples. By 42.4% ($p<0.05$) higher concentration (327.5 µg/kg) of this toxin was found in the samples from conventional farms. The determined maximum concentration amounted to 625 µg/kg.

Biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine and cadaverine) represent undesirable compounds in silages. Histamine was detected in 90% samples from farms of both categories yet by 85% ($p<0.05$) higher concentrations (12.36 mg/kg) were established in silage samples from conventional farms. Higher concentrations of putrescine (123.62 mg/kg) and cadaverine (1,722.52 mg/kg) were found in silage samples from conventional farms: 10.8% ($p<0.05$) and 21.05% ($p<0.05$). Tyramine concentration (119.56 mg/kg) was by 17.82% ($p<0.05$) higher in silage samples from organic farms.

Identification of fungi and testing for toxicity by PCR method

By PCR method of molecular biology, it was determined that among 16 *Fusarium* spp. the dominant were: *F. sporotrichoides* – 43.75%, *F. poae* – 12.5% and *F. graminearum* – 18.75%. Using succession of oligonucleotides *TRI5* it was determined that 56.25% of fungi of this genus are responsible for the synthesis of trichothecene. Using primers *apa2* and *omt1*, it was determined that 28.57% of the investigated *Aspergillus* cultures are responsible for production of aflatoxins. Using PCR method, we failed to differentiate *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. to species.

Correlation of hygienic quality of raw material and silage with chemical fermentation parameters

During the present study, the correlation of the hygienic quality of raw material and silage with chemico-fermentative parameters was established.

The chemico-fermentative parameters of maize silage are given in PUBLICATION II, Table 1. The average value of pH in the tested samples varied from 3.84 (min. 3.48–max. 4.33) to 3.93 (min. 3.60–max. 4.20) whereas the concentration of ammonium nitrogen ranged between 10.55 (min. 7.67–max. 13.80) and 11.06 (min. 7.54–max. 13.79). The correlations between mycotoxins, amines, hygienic quality and chemico-fermentative parameters are shown in PUBLICATION II, Table 2. Weak insignificant correlations between the concentrations of various mycotoxins and the content of dry matter in silage were determined. A positive average corre-

lation ($r = 0.67$, $p < 0.05$) was only determined between DON and the content of dry matter in silage 8 months after storage. A strong negative correlation was determined between pH of silage and ZEA concentration ($r = -0.50$, $p < 0.05$ and $r = -0.71$, $p < 0.05$) 3 and 8 months after storage and between pH of silage and concentration of T-2/HT-2 toxins ($r = -0.82$, $p < 0.05$) 8 months after storage.

A strong negative correlation between the content of dry matter in silage and tyramine and putrescine (respectively $r = -0.64$, $p < 0.05$; $r = -0.57$, $p > 0.05$) was determined 3 months after storage.

The chemico-fermentative parameters of perennial grass silage from organic and conventional farms are given in PUBLICATION III, Table 1. Correlation coefficients between biogenic amines, mycotoxin concentrations and chemical-fermentation parameters and silage are given in PUBLICATION III, Table 2. A strong negative correlation ($p < 0.05$) was determined between mycotoxins AF (total), ZEA concentrations and the content of dry matter and pH. A strong correlation was determined between the concentrations of mycotoxins DON and T-2/HT-2 and the content of ammonia and lactic acid in silage. A strong positive correlation was determined between tyramine, putrescine, cadaverine and ammonia, the content of dry matter, proteins and fatty acids in silage. Histamine in samples of silage showed no correlation with any chemical or fermentation parameters.

Contamination with mycotoxins determined by regular control tests and tests performed on problem cases

In silages delivered from different Lithuanian farms for mycotoxin control tests, the highest average concentrations of mycotoxin AFB₁ were determined in 2015 in maize silage (7.5 µg/kg) 1–2 months after storage and silage of perennial grasses (7 µg/kg) from trench 3–7 months after storage whereas the lowest average concentrations (0.65 µg/kg) were determined in 2013 in maize silage 8 months after storage. The highest ZEA concentration (2000 µg/kg) was established in 2014 in one sample of maize silage 1–2 months after storage. The highest average DON concentrations (750 µg/kg) were found in maize silage >8 months after storage in 2012 and in perennial grass bales (750 µg/kg) 1–2 months after baling in 2013.

In the problem cases, when outbreaks of acute cow health disorders (elevated number of somatic cells accounted for 33.3% and abortions for 33.3% of the total number of cases) of unknown origin occurred in farms as a possible result of contamination of fodder with toxins, the laboratory received 15 samples of silage.

Tests for toxicity of silage contaminated with mycotoxins and cytotoxicity of pure mycotoxins using target cells of organs

It was determined that exposition of cell line BHL-21 to least contaminated with toxins (i.e. DON – 450 µg/kg and ZEA – 130 µg/kg; T-2 – 60 µg/kg) sample 5 did not reduce cell proliferation by more than 50%. Cell proliferation was not reduced by more than 50% also after exposition to sample 6 (ZEA – 1200 µg/kg; AFB₁ – 13 µg/kg) with the highest AFB₁ and ZEA concentrations and absence of DON.

Exposition of MH-22A cell line for 24 hours to fodder contaminated with mycotoxins DON, ZEA, AFB₁, and T-2 reduced cell proliferation by not more than 50% in all samples. The strongest effect was observed after 48 hours of exposition to sample 5 (ZEA – 130 µg/kg; DON – 450 µg/kg; T-2 – 60 µg/kg) and the weakest one after exposition to sample 6 (ZEA – 1200 µg/kg; AFB₁ – 13 µg/kg).

Exposition of RPAEC cell line to DON, ZEA, AFB₁, and T-2 mycotoxins in all cases reduced cell proliferation by less than 50%. The strongest effect was produced by sample 4 with the highest DON concentration 550 µg/kg, ZEA – 270 µg/kg, T-2 – 50 µg/kg.

Target organ cells HeLa, BHL-21, RPAEC, and MH-22A were used for determining the effect of DON (1250 µg/kg), ZON (1560 µg/kg), AFB₁ (8.5 µg/kg) and their combinations on cell apoptosis and proliferation. The cells were exposed to crystalline mycotoxins and their mixtures for different time spans: 24, 48 and 72 hours.

By the values of optical density obtained by MTT cell proliferation assay the strongest metabolic activity was determined for RPAEC cells 72 hours ($p < 0.05$), DON – BHL-21 ($p < 0.05$) and RPAEC ($p < 0.05$) cell lines after 72 hours of exposition.

Comparison of the impact of various crystalline mycotoxins and their combinations on cell cultures showed the highest suppressive effect of DON/ZEA on BHL-21, AFB₁/DON/ZEA on MH-22A and AFB₁/ZEA on HeLa and RPAEC cell lines after 72 hours of exposition.

Comparison of the suppressive effect of mycotoxins after 24 and 72 hours of exposition showed the strongest suppressive effect of various mycotoxins and their combinations after 72 hours of exposition. The strongest effect of all three mycotoxins on the metabolic activity (about 50% after 72 hours ($p < 0.05$)) was determined for liver MH-22A cells (LD₅₀) exposed to concentrations: AFB₁ 8.5 µg/l, ZEA 12,500 µg/l and DON 1,250 µg/l. The combination DON/ZEA (1,250/1,560 µg/l) produced the strongest effect on the metabolic activity of kidney cells BHL-21 ($p > 0.05$) after 72 hours of exposition.

By optical density values using CV dyes it was determined that AFB₁ produced the strongest effect (cell apoptosis exceeded 50%) on cell lines BHL-21 and MH-22A ($p < 0.05$), DON on kidney cell line BHL-21 ($p < 0.05$) and RPAEC ($p < 0.05$) 72 hours after exposition.

Comparison of the effect of mycotoxins and their combinations on cell apoptosis showed that it was strongest on cell line RPAEC ($p < 0.05$) produced by AFB₁/DON/ZEA and on cell lines BHL-21 ($p < 0.05$) and RPAEC ($p < 0.05$) produced by AFB₁/ZEA after 72 hours of exposition.

Comparison of exposition for 24 and 72 hours showed that mycotoxins and their combinations most strongly affected all cell cultures after exposition for 72 hours.

A possibly genotoxic effect of mycotoxins AFB₁, ZEA, DON, and ZEA/DON on bovine lymphocytes, after exposition to the highest concentrations, was determined *in vitro*. Analysis of chromosomal aberration spectrum showed the highest total number of cells with lesions after exposition of lymphocyte cells to ZEA (1,560 $\mu\text{l/l}$) and the lowest after exposition to DON (1,250 $\mu\text{l/l}$). The highest percentage of lesions after exposition of lymphocytes to mycotoxins was accounted for by breaks and gaps of chromatids indicative of instability of genome. The highest percent of gaps was determined after exposition of lymphocyte cells to DON and the highest percent of breaks after exposition to combination ZEA/DON (1,560 $\mu\text{l/l}$ /1,250 $\mu\text{l/l}$). It was also determined that ZEA affected the changes in the number of chromosomes (aneuploidy). Evaluation of the spectrum of chromosome aberrations after exposition of bovine lymphocyte cells to AFB₁ (8.5 $\mu\text{l/l}$) revealed the strongest abnormal changes of chromatids: breaks and gaps.

The frequencies of chromosomal aberrations of control and mycotoxin-affected lymphocyte cells differed. The mycotoxin-affected lymphocyte cells had breaks and gaps, which represent only the initial lesions of DNA.

Effect of naturally mycotoxin-contaminated fodder on dairy cows and evaluation of the efficiency of detoxification preparation

Cereal and ensiled fodders from farm X were tested for contamination with mycotoxins. It was determined that fungi *Aspergillus* spp. were dominant in cereal mixture, *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. in perennial grass hay, and *Penicillium* spp. in the straw of oat and field peas.

The smallest number of viable spores, i.e. 4 log cfu/g, was determined in the silage of lucerne and cocksfoot grasses and the largest, 4.73 log cfu/g, in cereal mixture.

The highest concentration of ZEA, 1,000 µg/kg, was in perennial grass silage, the lowest, 270 µg/kg, in cereal mixture. The highest concentration of DON, 6,000 µg/kg, also was determined in the perennial grass silage. The smallest concentration, 350 µg/kg of this toxin was established in oat, pea vine and lucerne silage. AFB₁ concentrations were: 10 µg/kg in cereal mixture and 4 µg/kg in perennial grass hay.

During the assay, there occurred no cow deaths or injury. Yet one acute mastitis was diagnosed and properly treated in each of the groups. It was assumed that mastitis did not affect the assay results. During the assay, the health status of cows of both groups conformed to physiological norms (PUBLICATION I, Table 2).

Milk yeal increased by 12% ($p>0.05$) in the experimental cow group (EG), which was fed with mycotoxin absorbent and by 6.1% ($p>0.05$) in the control group (CG) which did not receive mycotoxin absorbents (PUBLICATION I, Table 4). The number of somatic cells increased by 73.68% ($p<0.05$) in the CG. Haematological blood parameters varied within physiological range (PUBLICATION I, Table 5). Biochemical blood parameters, except urea, varied within physiological range. The concentration of urea increased more than two-fold ($p>0.05$). IgA decreased by 16.17% ($p>0.05$) in the CG and increased by 14.45% ($p<0.05$) in the EG (PUBLICATION I, Table 6).

Usage of plants extracts for improvement of hygienic quality of silage

Before adding to raw maize mass, the inhibitory effect of water and ethanol extracts of thyme and oregano on the most widespread in ensiled fodder fungi *A. fumigatus* and *A. niger* was tested. The strongest effect against *A. fumigatus* was demonstrated by ethanol extract of thyme, yet it was completely ineffective against *A. niger*. The water extract of thyme reduced proliferation of *A. fumigatus* by 34% yet did not inhibit proliferation of *A. niger*. The water extract of oregano did not inhibit proliferation of any chosen species fungi. However, the ethanol extract of oregano was effective against *A. fumigatus* (reduced proliferation by 88%) and *A. niger* (by 60%).

The highest concentrations of carvacrol and thymol were established in ethanol extracts of thyme. These phenolic compounds were found neither in oregano water extracts of different concentrations nor in thyme water extract of lower concentration.

Chemico-fermentative parameters. pH in all samples of silage varied from 3.92 to 4.04. The highest content of dry matter was determined in

control sample (389.05 g/kg) and R-VE-25 (375.5 g/kg). The smallest amount was determined in R-VE-50 (303.7 g/kg). The highest concentration of ammonium nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$) was in control sample without additives (4.5% total N) and in sample R-VE-50 (5.5% total N). Oregano water extracts, R-VE-50 and R-VE-25, contained highest concentrations of acetic acid whereas R-VE-25 had the lowest concentration of lactic acid among all samples. After addition of extracts into raw material, the amount of dry matter in silage samples decreased in comparison with the control sample (K).

Analysis of *hygienic quality* of control sample showed the highest total number of bacteria and fungi and mycotoxins DON and T-2.

The smallest number of fungi was established in the samples with biological inoculant (KG), i.e. by 17.7% ($p < 0.05$) smaller than in control samples with the highest numbers of fungi and bacteria. The differences of the number of lactic acid bacteria and yeasts were statistically insignificant.

The smallest AFB₁ concentration, i.e. $< 1.00 \mu\text{g/kg}$, was established in control sample (K), in the sample with inoculant (KG) and in the sample with ethanol extract of thymus.

The highest ZEA concentrations, i.e. more than $500 \mu\text{g/kg}$, were determined in the samples with ethanol (KS) and water (KV), samples with oregano water extract (R-VE-25) and samples with silage inoculants (KC). The highest concentrations of DON, i.e. more than $400 \mu\text{g/kg}$, were in control sample (K) and in the sample with ethanol extract of thyme (C-EE-25). The highest concentration of toxins T-2 was in control sample (K).

Conclusions

1. Analysis of hygienic quality of raw maize produced in Lithuania and maize silage showed that:
 - 1.1. The highest number of fungi ($4.65 \log \text{cfu/g}$) was observed in raw maize which decreased by 17.49% ($p < 0.05$) 8 months after storage. The smallest number of yeast in raw mass ($4.46 \log \text{cfu/g}$) increased by 42.27% 8 months after storage. *L. monocytogenes* was found in greatest abundance in raw maize samples. *C. perfringens* was detected in equal number of samples of raw material and silage 8 months after storage.
 - 1.2. Twelve species of fungi were isolated in raw maize and in silage 3 months after storage. Eight species of fungi were identified in silage 8 months after storage. The raw material was predominated by *Alternaria* spp. (isolated and identified 77.17%), *Fusarium* spp. (37.54%), *Aspergillus* spp. (14.49%),

and *Penicillium* spp. (0.89%). The content of *Alternaria* spp. 99.88%. ($p<0.05$) and *Fusarium* spp. 98.85% decreased in silage 3 months after storage. Yet the content of *Aspergillus* spp. increased by 46 times ($p<0.05$) and *Penicillium* spp. ($p<0.05$) by 28 times. Eight months after storage, *Aspergillus* spp. was higher by 81 times ($p<0.05$) and *Penicillium* spp. by eight times ($p>0.05$) than in the raw material.

- 1.3. The highest average ZEA (880.4 $\mu\text{g/kg}$), DON (2,600 $\mu\text{g/kg}$) and OTA (29.15 $\mu\text{g/kg}$) concentrations were established in maize silage 3 months after storage. The highest values of T-2/HT-2 (147.25 $\mu\text{g/kg}$) and AF (total) (20.05 $\mu\text{g/kg}$) were found 8 months after storage. By 3.2% higher number of maize silage samples 3 months after storage contained gliotoxin. The highest concentrations of biogenic amines were found in silage samples 3 months after storage.
2. Analysis of hygienic quality of raw perennial grasses and baled silage from organic and conventional farms showed that:
 - 2.1. Statistically significantly highest number of fungi and yeasts was in raw material. Eight months after baling, their number decreased. Raw samples from organic farms contained higher concentrations of fungi and lower concentrations of yeasts than samples from intensive farms. A higher number of samples from intensive farms contained *L. monocytogenes*. *C. perfringens* was detected in equal number of samples from both types of farms.
 - 2.2. In comparison with conventional farms, the concentrations of *Alternaria* spp. *Fusarium* spp. in the raw material from organic farms were respectively by 20% ($p>0.05$) and 4% ($p>0.05$) higher. The concentration of *Aspergillus* spp. was by 53% ($p>0.05$) and *Penicillium* spp. by two times ($p>0.05$) higher in the silage from organic farms 8 months after baling.
 - 2.3. The highest average concentrations of mycotoxins DON (215 $\mu\text{g/kg}$) and AF (total) (1.04 $\mu\text{g/kg}$) were established in the raw material of perennial grasses from organic farms and ZEA (361 $\mu\text{g/kg}$) from conventional farms. The highest average concentrations of mycotoxins in perennial grass baled silage were as follows: DON (327.5 $\mu\text{g/kg}$) from intensive farms and ZEA (391 $\mu\text{g/kg}$), T-2/HT-2 (112.3 $\mu\text{g/kg}$) and AF (total) (30.68 $\mu\text{g/kg}$) from organic farms. The number of silage samples

with gliotoxin was by 20% higher in organic farms. In comparison with conventional farms, the samples of silage from organic farms contained smaller concentrations of biogenic amines, histamine, putrescine and cadaverine but higher concentration of tyramine.

3. Correlations between hygienic and chemical fermentation parameters were determined:
 - 3.1. Raw maize showed strong negative correlation ($p < 0.05$) between mycotoxins ZEA, T-2/HT-2 and pH. Three months after maize mass storage, strong negative correlations were determined between ZEA and pH, ZEA and lactic acid bacteria; AF (total) and ammonia. Eight months after maize mass storage, strong negative correlations ($p < 0.05$) were determined between ZEA, T-2/HT-2 and pH; strong positive correlations ($p < 0.05$) between DON and dry matter; OTA and lactic acid bacteria; T-2/HT-2 and lactic acid bacteria and fatty acid; AF (total) and propionic acid.
 - 3.2. Strong negative correlations ($p < 0.05$) were determined in baled perennial grass silage between mycotoxins AF (total), ZEA and dry matter; AF (total), ZEA and pH. A strong positive correlation ($p < 0.05$) was determined between tyramine, putrescine, cadaverine and ammonia; strong negative ($p < 0.05$) between tyramine and dry matter; cadaverine and dry matter; tyramine, putrescine, cadaverine and raw proteins.
4. The average concentrations of mycotoxins in ensiled fodder from different Lithuanian farms analysed in 2011–2015 at the Animal Welfare Research Laboratory were as follows: AFB₁ (0.65–13 µg/kg), DON (200–750 µg/kg), ZEA (180–2,000 µg/kg).
5. It was determined that exposition of target cells of organs to pure mycotoxins, highest mycotoxin concentrations established in Lithuania, the strongest inhibitory effects were produced by: AFB₁ on RPAEC cell line ($p < 0.05$), DON on BHL-21 ($p < 0.05$) and RPAEC ($p < 0.05$) cell lines after 72 hours. Comparison of the effects of different pure mycotoxins and their combinations on cell cultures showed the following strongest proliferation-suppressive impact after 72 hours of exposition: DON/ZEA on BHL-21 ($p > 0.05$), AFB₁/DON/ZEA on MH-22A ($p < 0.05$), and AFB₁/ZEA on HeLa ($p < 0.05$) and RPAEC ($p < 0.05$) cell lines. It was determined that extracts of naturally contaminated fodder with myco-

toxins DON, ZEA, AFB₁, and T-2 produced the strongest proliferation suppression effect on RPAEC cell line.

6. Long-lasting feeding of dairy cows with fodder naturally contaminated with mycotoxins produced by the most widespread in Lithuania *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. entailed changes of the chemical composition of milk, increase of the number of somatic cells and decrease of IgA. Detoxification preparation MycofixPlus 3 mitigated the negative effect.
7. Oregano and thyme ethanol extracts added to maize silage reduced the number of fungi, total number of bacteria and DON and T-2 concentrations.

Recommendations

1. It is recommended to determine the number of fungi and yeast colonies 3–8 months after storage or baling in order to evaluate the aerobic stability of fodder and possible contamination with secondary metabolites.
2. Screening of raw mass and silage for mycotoxins at different times after filling or baling should be performed because, according to our research data, the investigated raw material is contaminated with *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and other possibly toxicogenic genera and mycotoxins.
3. As tests for mycotoxins are rather expensive the tests of different target cell lines of organs may be used for assessment of fodder toxicity.
4. Even good practice is unable to prevent from silage contamination with mycotoxins. Therefore, it is recommended to add detoxification preparations to fodder. Preliminary, the expedience of the use of preparations should be evaluate. In our opinion, additives should be used when the following concentrations of mycotoxins were found: AFB₁ > 5 µg/kg, ZEA > 600 µg/kg, and DON – > 600. The up-to-date preparations should be chosen, as for example Mycofix Plus 3E, which would include not only the absorptive but also biological, fermentation and immunity stimulating groups.

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Jurgita Jovaišienė
E-mail: jurgita.jovaisiene@lsmuni.lt

Education

- 2008** Finished studies at Faculty of Veterinary Medicine, Lithuanian Veterinary Academy and obtained the diploma Doctor of Veterinary Medicine
- 2010** Finished Residency of Veterinary medicine studies in Faculty of Veterinary Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, qualification of Veterinary sanitary of animal products
- 2011** Applied for PhD studies at the Department of Food Safety and Quality, the Faculty of Veterinary Medicine, Lithuanian University of Health Sciences

Work experience

- 2015–2016** Assistant at Lithuanian University of Health Sciences
- 2016–present** Lector at Lithuanian University of Health Sciences

PADĖKA

Nuoširdžiai noriu padėkoti savo darbo vadovui prof. dr. Broniui Bakučiui už skatinimą, paramą ir patarimus atliekant šį mokslinį darbą.

Taip pat noriu padėkoti už visapusišką pagalbą ir konsultacijas doc. dr. V. Baliukonienei.

Dėkoju dr. A. Kačergiui (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centras) ir dr. A. Paškevičiui (Gamtos tyrimų centras) už konsultacijas ir pagalbą.

Esu dėkinga dr. V. Bukelskienei ir dr. D. Baltriukienei (VU, Biochemijos institutas) už nuoširdų ir draugišką bendravimą, suteiktas žinias, konsultacijas.

Dėkoju prof. dr. P. Matusevičiui už pagalbą, tarpininkavimą, siekiant atlikti tyrimus Varmijos ir Mozūrijos Universiteto Olštyne Lenkijoje, bei šio Universiteto Gyvūnų bioinžinerijos fakulteto mokslininkams prof. dr. K. Lipiński, prof. dr. C. Purwin, prof. dr. Z. Antoszkiewicz, M. Fijałkowska už konsultacijas ir pagalbą, atliekant tyrimus.

Dėkoju Fizinių ir technologijos mokslų centro Medžiagų analizės laboratorijos vadovei dr. Ritai Butkienei už konsultacijas ir pagalbą, atliekant tyrimus.

Nuoširdžiai dėkoju LSMU VA GTF Biologinių sistemų ir genetinių tyrimų instituto kolektyvui bei prof. dr. I. T. Miceikienei ir doc. dr. N. Makštutienei už suteiktą metodinę pagalbą ir sudarytas sąlygas atlikti mokslinius tyrimus.

Dėkoju Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto Cheminių tyrimų skyriaus patarėjui P. Druliai.

Taip pat dėkoju LSMU VA VF Stambiųjų gyvūnų klinikos Gyvūnų reprodukcijos laboratorijos vadovui, prof. habil. dr. Henrikui Žilinskui ir visam laboratorijos kolektyvui už galimybę pasinaudoti laboratorijos įranga, atliekant tyrimus.

Dėkoju LSMU VA Gyvulininkystės technologijos fakulteto docentei dr. J. Černiauskienei už vertingus patarimus.

Dėkoju LSMU VA VF Stambiųjų gyvūnų klinikos veterinarijos gydytojai laboratorinei diagnostikai Ritai Girdvainienei už konsultacijas ir pagalbą, atliekant tyrimus.

Esu labai dėkinga recenzentams prof. habil. dr. H. Žilinskui ir prof. dr. Rasai Želvytei už tikslias ir vertingas pastabas bei patarimus, tobulinant disertacinį darbą.

Doktorantūros metu atlikti tyrimai finansuoti LSMU Mokslo fondo ir LSMU VA VF Maisto saugos ir kokybės katedros Gyvūnų gerovės tyrimo laboratorijos.