

NẤM MỐC **và ĐỘC TỐ AFLATOXIN**



**TRONG THỨC ĂN
CHĂN NUÔI**



NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

PGS.TS. ĐẬU NGỌC HÀO - TS. LÊ THỊ NGỌC DIỆP

NẤM MỐC VÀ ĐỘC TỐ AFLATOXIN TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
HÀ NỘI - 2003

LỜI NÓI ĐẦU

Nấm mốc và độc tố nấm mốc trong thức ăn chăn nuôi có ảnh hưởng rất lớn đến năng suất vật nuôi. Nấm mốc phát triển trong nguyên liệu và thức ăn chăn nuôi không những làm giảm giá trị dinh dưỡng của thức ăn mà còn sản sinh ra các độc tố gây bệnh cho vật nuôi. Hàng trăm loài nấm mốc và độc tố nấm mốc đã được biết là có mặt trong thức ăn và nguyên liệu làm thức ăn. Có 3 nhóm chính thường gặp nhất là: *Aspergillus*, *Penicillium* và *Fusarium*. Cả 3 nhóm này đều sản sinh ra độc tố. Trong hàng'chục độc tố nấm mốc nguy hiểm phải kể tới Aflatoxin. Aflatoxin là độc tố của nấm *Aspergillus flavus* và *parasiticus*. Nấm mốc này có mặt nhiều ở ngô, lạc và một vài loại hạt khác có chứa dầu. Aflatoxin không chỉ là độc tố nấm mốc gây nhiễm độc, gây rối loạn chức năng, gây suy giảm miễn dịch, thoái hóa gan thận mà còn gây chết gia súc trong trường hợp nhiễm độc hàm lượng lớn độc tố. Aflatoxin cũng được chứng minh là chất độc gây ung thư cho động vật thí nghiệm, do đó rất nguy hiểm đối với con người.

*Hiểu biết về nấm mốc, về Aflatoxin để có những biện pháp phòng chống, bảo vệ vật nuôi và con người là cần thiết. Vì vậy chúng tôi đã biên soạn cuốn sách **"Nấm mốc và độc tố Aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi"** nhằm cung cấp cho bạn đọc những thông tin bổ ích về vấn đề này.*

Trong quá trình biên soạn chắc chắn không tránh khỏi thiếu sót, rất mong nhận được sự đóng góp của đông đảo bạn đọc để cuốn sách được hoàn thiện hơn.

Các tác giả

Chương I

NẤM MỐC VÀ ĐỘC TỔ NẤM MỐC TRONG THỨC ĂN VÀ NGUYÊN LIỆU THỨC ĂN CHĂN NUÔI

1.1. NẤM MỐC

1.1.1. Khái niệm về nấm mốc

Nấm mốc là vi sinh vật (vi nấm) có cấu tạo gần giống với giới thực vật, sống ký sinh hay hoại sinh trên nhiều loại chất khác nhau, đặc biệt là các chất hữu cơ, đơn giản nhất là các hydratecacbon. Người ta tìm thấy nấm mốc ở khắp mọi nơi từ phân, đất, trên các cây cối mục nát, quần áo, giấy dép, trên ngũ cốc, ngay cả trên cơ thể sống của động vật và con người.

Nấm mốc cũng được xếp vào 1 trong 5 loại hình thái tạo nên sự sống trên trái đất. Theo Whihaker, 5 loại hình thái đó là:

- Thực vật (Plant)
- Động vật (Animal)
- Nguyên bào (Protista)
- Vi khuẩn (Bacteria)
- Nấm mốc (Fungi)

Theo đó nấm mốc có một số đặc điểm như sau:

- Có cấu trúc tế bào xác định, vách tế bào là cellulosa, có nguyên sinh chất và nhân.
- Không có chất diệp lục, do đó không tự sống được như thực vật, sống ký sinh trên các sinh vật khác.
- Sinh sản và phát triển theo 2 phương thức là vô tính và hữu tính.

1.1.2. Sinh sản và phát triển

Nấm mốc có mặt trên khắp thế giới không kể là khu vực nhiệt đới, ôn đới, khí hậu nóng hay lạnh. Chúng có thể phát triển quanh năm, mùa hè, mùa thu, mùa đông hay mùa xuân. Đối tượng để nấm mốc ký sinh hay hoại sinh gồm hầu hết mọi thứ vật chất: trong đất, phân, nước, cây mục, đồ dùng, lương thực thực phẩm, hoa quả và thậm chí trên một số các loại vật chất hầu như không có chất dinh dưỡng như dụng cụ quang học, kim loại và các chất dẻo vv... Sự sinh sản và phát triển của nấm mốc rất đa dạng, gần gũi với thực vật hơn là vi sinh vật - có 2 con đường sinh sản và phát triển chính sau đây:

a) Sinh sản vô tính

Sinh sản vô tính là hình thức phổ biến nhất đối với các loại nấm có mặt trên lương thực và thực phẩm cũng như thức ăn chăn nuôi.

Phương thức đơn giản là hình thành bào tử (spore), có 2 dạng bào tử là bào tử trần (conidi) và bào tử kín (ascus). Bào

tử kín sau giai đoạn chín sẽ vỡ vỏ bọc và giải phóng các bào tử ra ngoài. Bào tử trần được hình thành đơn giản, từ sợi nhánh phát sinh trên sợi mẹ, đầu mút của sợi phình to gọi là bong (head or vesical), trên bong hình thành các thể bình (metular or phialite), trên các thể bình hình thành các bào tử trần, thành từng chuỗi. Bào tử trần còn được hình thành trực tiếp trên các sợi nấm phân hóa và được gọi là các tiền bào tử (proconidi). Các bào tử dạng nang có thể đơn độc (chôi) hoặc thành chuỗi bào tử già ở gốc, bào tử non ở ngọn, vì bào tử vừa được hình thành lại có khả năng tạo ra các bào tử mới. Bào tử kín thường ở dạng bọc hay nang bào tử. Trong bọc hay nang có chứa nhiều bào tử khác nhau. Bào tử kín cũng được hình thành từ sợi nấm, đầu nút của sợi được phình lên gọi là trụ (columella) và hình thành bào tử trong nang, các bào tử kín sau khi chín được giải phóng ra ngoài. Bào tử nói chung có màng hay gọi là vỏ dày có thể chịu đựng được điều kiện không thuận lợi của môi trường bên ngoài, khi gặp môi trường thuận lợi có thể nảy mầm và phát triển thành khuẩn lạc nấm và lại tiếp tục chu kỳ phát triển.

b) Sinh sản hữu tính

Sinh sản hữu tính là do 2 đầu sợi nấm tiếp hợp với nhau mà tạo thành các bào tử được gọi là bào tử tiếp hợp (zygospore), thường thấy trong các loài Mucor.

Bào tử nang (ascospore) được hình thành theo một phương thức phức tạp, từ một sợi nấm sinh sản tạo thành các

nang (ascus), trong nang có chứa các bào tử, nhiều nang bào tử được bọc trong các túi hình tròn (cleistothecium). Khi các nang chín vỡ ra, bào tử được giải phóng ra ngoài và gặp điều kiện thuận lợi phát triển thành khuẩn lạc nấm mốc.

1.1.3. Các nhân tố ảnh hưởng đến sinh sản và phát triển của nấm mốc

Có 8 nhân tố ảnh hưởng đến sinh sản và phát triển của nấm mốc:

- Lượng nước có trong cơ chất (dạng nước hoạt động a_w)
- Nồng độ ion H^+
- Độ ẩm và nhiệt độ môi trường.
- Thành phần các chất trong không khí (chủ yếu là O_2 và CO_2)
- Trạng thái vật chất (thể lỏng, thể rắn)
- Hàm lượng chất dinh dưỡng (protein, đường)
- Các yếu tố đặc biệt
- Bảo quản vật chất

Tuy nhiên có 4 nhân tố đặc biệt quan trọng là hàm lượng nước tự do trong vật chất (a_w); nhiệt độ và độ ẩm môi trường; thành phần không khí và điều kiện bảo quản.

a) Nước tự do trong vật chất

Hàm lượng nước trong vật chất tương đương với độ ẩm tương đối, là biểu thị trạng thái hoạt động của nước trong cơ

chất. Độ ẩm tương đối càng cao, mức độ tự do của nước trong cơ chất càng cao. Độ ẩm tương đối càng thấp, khả năng gắn kết với cơ chất càng bền chặt. Mức độ nước tự do ảnh hưởng đến khả năng xâm nhập và phát triển của nấm mốc.

Lượng nước tự do trong vật chất lần đầu tiên được Shott (1957) đề cập. Theo đó lượng nước tự do (a_w) là một khái niệm về hóa học nói lên tỷ lệ phát triển của nấm mốc.

Người ta biểu diễn hàm lượng nước tự do (a_w) trong vật chất và mối quan hệ với độ ẩm không khí theo công thức sau:

$$a_w = \frac{P_D}{P_S}$$

Trong đó:

P_D : là áp lực bộ phận bốc hơi trong vật chất

P_S : là áp lực nước bão hòa trong cùng một điều kiện

Do đó độ ẩm tương đối (RH) được biểu thị

$$RH = a_w \times 100$$

a_w là mối tương quan số học với độ ẩm tương đối (RH) được biểu thị bằng số thập phân. Nếu một mẫu nguyên liệu được giữ ở một nhiệt độ nhất định (không đổi) trong một phạm vi kín cho đến khi lượng nước trong mẫu đạt tới cân bằng sự bốc hơi không khí xung quanh thì khi đó:

$$a_w = RH/100$$

Như vậy có thể thấy vai trò của lượng nước tự do trong cơ chất thường trội hơn các nhân tố khác để kiểm soát sự phát triển của nấm mốc và xác định tính bền vững của sản phẩm.

Phạm vi phát triển tốt nhất của nấm mốc được xác định trong khoảng $a_w = 0,80-0,85$.

Bảng 1.1: Hàm lượng nước tự do (a_w) và sự thích hợp của một số chủng nấm mốc

Tên chủng	Tối thiểu	Tối ưu
<i>Alternaria alternata</i>	0,85	0,98
<i>Aspergillus flavus</i>	0,80	0,95
<i>A. niger</i>	0,88-0,89	0,96-0,98
<i>A. restrictus</i>	0,75	0,91
<i>Bysochlamy nivea</i>	0,89	—
<i>Cladospore herbrum</i>	0,88-0,90	0,95-0,96
<i>Mucor circinelloides</i>	0,90	—
<i>Paecilomyces varioti</i>	0,84	—
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,85	0,95
<i>P. expansum</i>	0,82	0,95
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,92-0,94	0,98
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	0,85	0,92-0,94
<i>Thamnidium elegans</i>	0,92-0,94	0,98
<i>Trichothecium roseum</i>	0,86-0,88	0,96
<i>Walleimia sebi</i>	0,75	—

Giống như nhiều vi sinh vật khác nhau, nấm mốc cần có nước để phát triển và sự chấp nhận lượng a_w thấp của nhiều loại nấm mốc rất là điển hình. Nhiều loại nấm mốc trong nông sản khô có khả năng phát triển ở a_w rất thấp, thấp hơn bất kỳ một vi sinh vật nào khác.

Mức độ chịu đựng với a_w thấp được biểu thị bằng mức a_w tối thiểu (minimum) mà ở đó chúng có thể nảy chồi và phát triển hệ sợi. Những loài nấm phát triển ở a_w thấp được gọi là loài ưa khô. Một trong những chỉ tiêu xác định loài ưa khô là nấm có thể phát triển được ở a_w thấp hơn 0,85. Chỉ rất ít loài có thể phát triển được ở a_w dưới 0,75 trong vòng 6 tháng. Như vậy nếu nông sản bảo quản trong khoảng độ ẩm tương đối từ 75-85% là thuận lợi cho sự phát triển và tấn công của nấm ưa khô ở điều kiện bảo quản bình thường trong vài tháng.

b) Nhiệt độ và độ ẩm môi trường

Nhiệt độ và độ ẩm môi trường được đánh giá là nhân tố quan trọng thứ 2 đối với sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc. Tuy nhiên nấm mốc có thể phát triển được trong phạm vi nhiệt độ rất rộng, từ 0-60°C, có thể chia ra một số nhóm như sau:

- Nhóm chịu nhiệt (Thermophile): Nhóm này phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ môi trường khá cao. Trung bình nhiệt độ phát triển là 30-40°C, tối đa là 50°C. Cũng có một

vài loài có thể phát triển được ở nhiệt độ 55-60°C (*Mucor pusillus*).

- Nhóm ưa nhiệt (Mesophile): Đây là nhóm phát triển tốt trong phạm vi nhiệt độ từ 10-40°C. Thích hợp nhất là 25°C. Phần lớn nhóm này thuộc hai loài là *Aspergillus* và *Penicillium*. Điển hình nhất là *A. versicolor* và *P. chrysogenum*.

- Nhóm chịu lạnh (Psychrophile): Có thể phát triển ở phạm vi nhiệt độ từ 7-10°C. Phần lớn nhóm nấm này thuộc loài *Fusarium*, có mặt ở các lục địa châu Âu, phát triển trên mì, mạch qua mùa đông. Một số loài điển hình là *F. conglutinan*, *A. versicolor*, *P. cyclopium*. Ngoài ra một số loài nấm mốc cũng có thể phát triển được trong một phạm vi độ ẩm rất rộng.

- Loài nấm ưa khô (Xerophile): Phần lớn loài nấm ưa khô thuộc loài *Aspergillus* và một số thuộc *Penicillium*. Người ta còn gọi là nấm trong bảo quản. Loài này phát triển được độ ẩm tương đối (RH) trong phạm vi từ 75 - 85%. Điển hình là *Alternaria tenuis*, *Cladosporium cladosporoides*, *Trichothecium roseum* v.v...

- Loài ưa ẩm cao: Phát triển được ở phạm vi độ ẩm từ 90-100%. Đại diện như *Epicoccum nigrum*, *Mucor circinelloides*, *Trichothecium roseum*.

**Bảng 1.2: Phạm vi nhiệt độ thích hợp đối với
một số loài nấm mốc**

Tên nấm mốc	Tối thiểu (°C)	Thích hợp nhất (°C)	Tối đa (°C)
<i>Absidia corymbifera</i>	—	35 - 37	45
<i>Alternaria alternata</i>	-2 - +5	20 - 25	31 - 32
<i>Aspergillus candidus</i>	3 - 4	20 - 24	40 - 42
<i>A. flavus</i>	6 - 8	35 - 37	42 - 45
<i>A. niger</i>	6 - 8	35 - 37	46 - 48
<i>A. parasiticus</i>	10 - 13	37	—
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2	25	35
<i>Byssochlamys fulva</i>	10	30 - 35	45
<i>Cladosporium herbrum</i> ,	-5 - -7	24 - 25	30 - 32
<i>Fusarium avenaceum</i>	- 3	25	31
<i>F.sporotrichioides</i>	2,5 - 2,7	23 - 30	35
<i>Mucor hiemalis</i>	4	36	44
<i>Penicillium expansum</i>	- 3	25 - 26	33 - 35
<i>Rhizopus microsporus</i>	12	30 - 35	42
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	5	24 - 30	37
<i>Thalmidium elegans</i>	- 7	27	—
<i>Trichothecium roseum</i>	15	25	35
<i>Wallemia sebi</i>	5	24 - 30	37 - 40

c) Độ pH thích hợp

Khác với một số vi khuẩn, nấm mốc có thể phát triển được ở phạm vi pH khá rộng, từ 2-8. Độ pH thích hợp nhất là từ 4,5-6,5, sự phát sinh và phát triển của nấm mốc không quá phụ thuộc vào độ pH của môi trường. Tuy nhiên sự hình thành độc tố lại rất phụ thuộc vào độ pH.

Bảng 1.3: Độ pH thích hợp nhất cho sự phát triển của một số loài nấm mốc

Loài nấm	Tối thiểu	Tối ưu	Tối đa
<i>Alternaria alternata</i>	< 2,7	5,4	> 8,0
<i>Aspergillus candidus</i>	2,1	—	7,7
<i>A. niger</i>	1,5	—	9,8
<i>Cladosporium herbrum</i>	3,1	—	7,7
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,0	—	9,0
<i>Mucor plumbeus</i>	—	7,0	—
<i>Neurospora sitophila</i>	> 3,0	5 - 6	> 8,0
<i>Penicillium cyclopium</i>	2,0	—	10,0
<i>Rhizopus stolonifer</i>	—	—	< 6,8
<i>Scopariopsis brevicaulis</i>	—	9 - 10	—
<i>Trichoderma konogi</i>	2,5	—	9,5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,0	6 - 7	8,0
<i>A. flavus</i>	2,5	7,5	> 10,5
<i>A. ochraceus</i>	3,0	6 - 7,5	> 8,0

1.2. NẤM MỐC TRONG THỨC ĂN VÀ NGUYÊN LIỆU THỨC ĂN

1.2.1. Nấm mốc trong thực phẩm

Như ta đã nói, nấm mốc có thể phát triển trên nhiều đối tượng vật chất khác nhau, từ các chất vô cơ nghèo chất dinh dưỡng như các loại kính, kính quang học, sắt, thép, sứ, xi măng, gạch ngói v.v... đến các loại chất hữu cơ giàu chất dinh dưỡng đặc biệt như các loại lương thực, thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Sự phát triển của nấm mốc trên vật chất đã gây những tổn thất mang nhiều khía cạnh khác nhau cả về chất lượng và số lượng. Nấm mốc phát triển trên cơ chất làm biến đổi màu sắc, mùi vị của cơ chất, làm giảm chất lượng, đặc biệt là các chất dinh dưỡng như glucoza, saccaroza, protein, axit amin, lipit, vitamin và các chất khoáng. Nấm mốc phát triển còn gây thối rữa cơ chất, tạo điều kiện cho nhiều loại vi khuẩn khác phát triển, đặc biệt là các loại hoại tử và như vậy gây thiệt hại về số lượng. Chưa có những thống kê đầy đủ về sự thiệt hại lương thực, thực phẩm do nấm mốc nói riêng, nhưng trong sự hư hại lương thực và thực phẩm nói chung thì vai trò của nấm mốc chiếm phần đáng kể. Theo thống kê về sự thiệt hại ngũ cốc và thực phẩm, hàng năm có thể lên tới xấp xỉ 10% trên phạm vi thế giới (theo FAO). Bên cạnh sự thiệt hại mang tính chất cơ học đơn thuần, còn có sự thiệt hại khác ảnh hưởng đến sức khỏe con người và đặc biệt là gia súc: đó là nấm mốc trong quá trình phát sinh và phát triển đã sản sinh ra nhiều độc chất khác nhau xâm nhập vào trong cơ chất.

Bảng 1.4: Một số nấm mốc sử dụng trong công nghiệp sản xuất các enzym (tóm lược theo Juger Reiss, 1982)

Nấm mốc	Enzym
Aspergillus melleus	Proteaza
A. niger	α -Amilaza, Glucoamylaza Catalaza, Cellulaza, Endo- β -gluconaza, Glucoza oxidaza, Hemicellulaza, Lipaza Maltaza, Pectinaza, Proteaza, Cellobiaza, Taunaza, Xylanaza, Lactaza, α -Galactosidaza
A. oryzae	α -Amylaza, Glucoamylaza, Cellulaza, Endo- β -gluconaza, Hemicellulaza, Pectinaza, Proteaza, Taunaza, Lactaza
A. phoenicius	Inulaza
Mortierella vinacea	α -Galactosidaza
Mucor javanicus	Lipaza
M. miehei	Lipaza, Esteraza, Proteaza
M. pulsillus	Proteaza, Lipaza, Esteraza
Penicillium emersonii	Endo - β - gluconaza
P. funiculosum	Dextranaza
P. lilacimum	Dextranaza
P. simplicissimum	Pectinaza
Rhizopus arrhizus	Liaza, Glucoamylaza
Rh. oryzae	α Amylaza, Glucoamylaza, Cellulaza, Endo - β - gluconaza, Hemicellulaza, Maltaza, Pectinaza
Rh. nivens	Lipaza, Glucoamylaza
Trichoderma viride	Glucoamylaza, Cellulaza, Hemicellulaza, Cellobiaza, Pectinaza

Bảng 1.5: Một số sản phẩm từ các loài nấm

Sản phẩm	Loài nấm
Axit citric	Aspergillus niger và các loại khác thuộc Aspergillus và Penicillium
Hồ phách (amber)	Rhizopus
Nước lên men từ táo	A. flavus, A. parasiticus, Penicillium, Corylophilum, Rhizopus stolonifer
Rượu vang	Aspergillus griseus, A. niger, P.chrysogenum
Axit glucoic	A. spesillus niger và các loài khác thuộc Aspergillus và Penicillium
Penicillium (kháng sinh)	Penicillium notatum, P.chrysogenum
Griseofulvin (kháng nấm)	Penicillium nigricans, P. patulum và các chủng thuộc Penicillium

Bảng 1.6: Một số loài nấm mốc thường gặp trên ngũ cốc và thực phẩm (tóm lược theo Jurger Reiss, 1982)

Ngô	Absidia sp., Aspergillus flavus, A. terreus, Cephalosporium sp., Fusarium sp., Mucor sp., Penicillium sp., Rhizopus sp., Aspergillus glaucus-groupe, A. fumigatus, A. niger, A. ochraceus
Mỳ	Penicillium sp, Alternaria sp, Aspergillus sp., chủ yếu là A. flavus; A. niger, A. ochraceus và nhóm A. glaucus, Absidia, Fusarium, Rhizopus, Scopulariopsis, Trichodema
Mạch	Absidia corymbifera, Aspergillus candidus, A. flavus, A. fumigatus, Mucor pusisillus, Paccilomyces varioti, Penicillium dupontii, P.roqueforti, A. nidulans, A. terreus, Cladosporium cladosporides, Scopulariopsis brevicaulis

Gạo	<i>Absidia corymbifera</i> , <i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. sydowi</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium islandicum</i>
Thịt lợn	<i>Alternaria</i> sp, <i>Aspergillus amstelodami</i> , <i>A. aurantiobrunneus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. conicus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. gracilis</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. penicilloides</i> , <i>A. ruber</i> , <i>A. sydowi</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. viridenutans</i>
Thịt gà	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp., <i>Cladosporium herbrum</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Rhizopus</i> sp.
Thịt bò	<i>Cladosporium herbrum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>P. spumulosum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Thamnidium elegans</i>
Giò	<i>Aspergillus amstelodami</i> , <i>A. chevalieri</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. repens</i> , <i>A. farinarius</i> , <i>A. wentii</i> , <i>penicillium melzynski</i> , <i>P. puberulum</i> , <i>P. variable</i> , <i>Scopulariopsis</i>
Chuối	<i>Fusarium roseum</i> , <i>Nigrospora musa</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Penicillium janthinellum</i>
Cam	<i>Alternaria citri</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>P. italicum</i>
Khoai tây	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>F. coeruleum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. salphureum</i>
Cà chua	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Byssosclamyces fulva</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp, <i>Penicillium expansum</i> , <i>Rhizopus</i> sp.
Lạc	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus ficuum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Fusarium</i> sp, <i>Paecilomyces</i> sp, <i>Penicillium</i> , <i>P. decumbens</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. paxilli</i> , <i>P. pinophilum</i> , <i>Rhizopus</i> sp.
Đậu tương	<i>Alternaria</i> sp, <i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. glaucus</i> groupe, <i>A. melleus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. urticae</i> , <i>P. viridicatum</i>

1.2.2. Ảnh hưởng của nấm mốc đối với giá trị của nguyên liệu thức ăn chăn nuôi

a) Ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng

Sự phát triển của nấm mốc trên thức ăn chăn nuôi đã làm ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng. Chúng làm giảm lượng tinh bột và thủy phân protein (Castor, 1981), làm mất đi lượng lipid do men lipaza của nấm mốc sản sinh ra (Bartov, 1982). Do vậy lượng chất xơ tăng lên trong hạt, ảnh hưởng đến quá trình tiêu hóa và giảm thấp năng lượng. Ảnh hưởng xấu này của nấm mốc thường xảy ra trong quá trình bảo quản và dự trữ nguyên liệu. Trước khi thu hoạch 2 loài nấm có thể xâm phạm vào ngũ cốc là *Alternaria* và *Fusarium* (William, 1986), tuy nhiên mức độ gây thiệt hại nhẹ. Những ảnh hưởng của chúng đối với thức ăn chăn nuôi và năng suất chăn nuôi lợn không rõ ràng. Trong quá trình bảo quản, sự phát triển và sinh trưởng của nấm mốc *Aspergillus* và *Penicillium* cũng đã làm giảm giá trị dinh dưỡng của nguyên liệu.

Theo Tindall (1983) ngô bị nhiễm nấm mốc giảm giá trị dinh dưỡng theo bảng sau:

	Năng lượng trao đổi (kcal/kg)	Protein (%)	Mỡ thô (%)	Khoáng (%)	Tinh bột (%)	Đường (%)
Ngô	3410	8,9	4,0	3,1	57,6	4,3
Ngô nhiễm mốc	3252	8,3	1,5	3,4	58,1	4,6

Trong trường hợp nhiễm mốc nặng hơn, làm biến đổi màu sắc ngô từ màu đỏ vàng thành màu xám tối và có mùi hôi của mốc thì có thể giảm tới 25% giá trị dinh dưỡng.

b) Ảnh hưởng đến mùi vị và tính ngon miệng

Trong quá trình phát triển, nấm mốc đã bài tiết ra môi trường những chất trao đổi, đặc biệt là các men phân giải chất dinh dưỡng như lipaza, proteaza, amilaza. Hệ thống men phân giải phong phú ở một số loài như *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *oryzae* v.v... đã gây những biến đổi mùi vị của cơ chất. Theo Lê Doãn Diên và Nguyễn Bá Tịnh (1981), Anfali và cộng sự (1989) thì chính sự phân hủy lipit của các hạt có dầu do *Aspergillus flavus*, *A. niger* và *A. fumigatus* đã làm giảm chất lượng dầu và tăng chỉ số axit do đó gây mùi hôi. Một số loài nấm mốc như *Mucor racemosus* hay *Cladosporium* có thể phát triển trong phạm vi nhiệt độ rộng, vì vậy nhiều khi các thực phẩm để lạnh vẫn có thể bị nhiễm nấm mốc.

Sự biến đổi màu sắc và mùi vị ảnh hưởng đến sự chọn lọc thức ăn của vật nuôi. Thức ăn đã làm cho lợn khó chịu, tuy nhiên trong trường hợp đói và không có thức ăn khác chúng vẫn chấp nhận và có thể quen dần với mùi vị đó. Riêng đối với gia cầm thì màu sắc và mùi vị có vai trò rất quan trọng, quyết định tính thèm ăn của chúng (Adret - Hausberger và Cumming, 1985). Ngựa rất mẫn cảm với mùi vị, ngược lại trâu bò, dê cừu ít mẫn cảm với mùi vị, nhưng chúng cũng có thể bỏ lại thức ăn bị mốc hoặc bẩn. Vì vậy, đôi khi người chăn nuôi đã làm tăng thêm mùi vị của thức ăn bằng cách cho thêm

rỉ đường hoặc bột khô lạc hay khô dầu dừa. Tuy nhiên trong nhiều trường hợp thì nguyên nhân là do nhiễm độc các chất độc có trong thức ăn chứ không phải do mất mùi vị thức ăn, đặc biệt nếu bổ sung khô lạc có nhiều Aflatoxin (Allcrot, 1969). Hoặc gia súc bị nôn mửa, không phải là do sự thiu thối của thức ăn mà do các độc tố thuộc nhóm Trichothecums (Deoxynivalenol và Nivalenol) của nấm Fusarium (Foryts, 1977).

c) Yếu tố kinh tế của việc sử dụng thức ăn bị nhiễm nấm mốc

Do không thể sử dụng lương thực đã bị mốc hoặc có chứa độc tố nấm mốc trực tiếp cho con người, người ta đã sử dụng chúng cho chăn nuôi với lý do chúng là những nguyên liệu rẻ tiền hơn. Câu hỏi đặt ra là những nguyên liệu này nên sử dụng cho loại vật nuôi nào: Trâu, bò, dê, cừu, hươu, lợn, gà v.v hàm lượng phối chế với thức ăn, dùng cho gia súc trưởng thành tốt hơn hay cho gia súc non v.v.

Ở Úc các nhà chăn nuôi đã tính toán kinh tế và hiệu quả của việc sử dụng thức ăn bị mốc. Trong quá trình chi phí cho vật nuôi, thức ăn chiếm 60-80% giá thành, nếu sử dụng có hiệu quả thức ăn và nguyên liệu thức ăn bị nhiễm mốc và giới hạn lượng chất độc nấm mốc trong thức ăn đều mang lại hiệu quả kinh tế.

Một thí dụ điển hình về sử dụng có hiệu quả thức ăn chăn nuôi bị nhiễm nấm mốc được Blaney và cộng sự thực hiện vào năm 1981 ở Úc như sau:

Bốn nhóm lợn được ăn ngô bị nhiễm mốc ở mức độ khác nhau, mốc chủ yếu là *Fusarium moniliforme* và *Diplodia maydis*. Trọng lượng thí nghiệm ban đầu trung bình đàn là 27,4kg.

Lô 1: dùng ngô tính giá 160 USD/ 1 tấn (có 4% mốc)

Lô 2: dùng ngô tính giá 135 USD/ 1 tấn (có 17% mốc)

Lô 3: dùng ngô tính giá 110 USD/ 1 tấn (có 21% mốc)

Lô 4: dùng ngô tính giá 110 USD/ 1 tấn (có 15% mốc)

Kết quả thu được về kinh tế do giá ngô ở 2 nhóm 3 và 4 rẻ. Chi phí thức ăn là 879,894 và 916 USD cho 1 lợn nái / 1 năm (lợn thịt được tính trọng lượng xuất chuồng 90kg). Tuy nhiên các chỉ tiêu như tiêu tốn và chuyển hóa thức ăn ở 2 lô sau thấp hơn 2 lô trước, nhưng không có sự sai khác nhau khi đạt trọng lượng tới 90kg

Bảng 1.7: Thí nghiệm sử dụng có hiệu quả thức ăn của Blaney và William (1991)

Các chỉ tiêu \ Lô đối chứng	1	2	3	4
Giá ngô cho 1 tấn (USD)	160	135	110	110
Nấm mốc (% hạt mốc)	4	17	21	15
Khẩu phần ăn tiêu tốn hàng ngày	1,94	1,88	1,84	1,84
Chuyển hóa thức ăn 1 tuần đầu	2,39	2,46	2,68	2,50
Khẩu phần ăn tiêu tốn hàng ngày	2,35	2,09	2,23	2,25
Chuyển hóa thức ăn (5 tuần tiếp theo)	2,54	2,57	2,52	2,57
Chi phí (USD) cho 1 lợn nái/năm (1 nái được tính 17 con)	897	894	916	916

Lô 1: Thức ăn tốt

Lô 2 và 3: Nhiễm *Fusarium moniliforme*

Lô 4: Nhiễm *Fusarium moniliforme* và *Diplodia maydis*.

Trọng lượng lợn thí nghiệm 27,4kg

Lợi nhuận tính từ thời điểm 20-50 kg và không có sự sai khác cho đến khi được 90kg.

Qua bảng trên cho thấy:

- Chỉ sai khác về số lượng thức ăn hàng ngày giảm đi (2 tuần đầu) và sự chuyển hóa kém ở các lô bị ăn thức ăn mốc.

- 5 tuần sau đó khả năng thích nghi tăng dần và có thể chịu đựng được.

- Lợi nhuận thu được do giá ngô bị mốc rẻ hơn bình thường.

Ngoài ra người ta có thể sử dụng tốt và có hiệu quả thức ăn bị nhiễm mốc, thậm chí cả độc tố nấm mốc, đặc biệt với các loài nhai lại như trâu, bò, dê, cừu bởi vì các con vật này có thể thích loại thức ăn mà con vật khác từ chối. Bò có thể ăn cả lõi ngô bị mốc và độc tố nấm mốc, đặc biệt là những nước chăn nuôi đại gia súc dạng gia đình nhỏ thì những thức ăn trên bị mốc sẽ không ảnh hưởng đến chúng, trừ khi người ta nuôi tập trung với mục đích đạt được sự tăng trọng nhanh.

d) Sử dụng có hiệu quả thức ăn bị nhiễm nấm mốc

Vấn đề sử dụng thức ăn bị nhiễm nấm mốc có ý nghĩa quan trọng về kinh tế hơn là ý nghĩa sử dụng mang tính kỹ

thuật. Bởi vì thức ăn bị mốc tùy theo mức độ đã làm giảm giá mua ở các mức độ khác nhau, thậm chí giảm 20%. Người ta cần phải tính toán xem đối tượng vật nuôi nào có thể sử dụng loại nguyên liệu đã bị mốc mà không ảnh hưởng nhiều tới sức khoẻ của chúng. Sự phối chế khẩu phần ăn là nhân tố quyết định đối với thức ăn và độc tố. Phải biết trước tỷ lệ mốc và hàm lượng các chất độc nấm mốc là bao nhiêu, từ đó có thể kết hợp với một lượng thức ăn tốt hơn để làm cho vật nuôi chấp nhận và chịu đựng được khẩu phần ăn đó. Một số ví dụ điển hình ở Queensland (1990) do sử dụng thức ăn bị nhiễm mốc đã làm giảm 15% giá trị dinh dưỡng và 7% lợi nhuận thu được. Nhưng bù lại, người ta đã tiết kiệm được 22% giá ngô do giảm hơn giá ngô tốt.

1.2.3. Một số loại nấm mốc thường gặp trong nguyên liệu thức ăn và thức ăn hỗn hợp của gia súc

Có thể thấy hệ nấm mốc trong thức ăn chăn nuôi rất phong phú. Hầu hết các nhóm nấm mốc chính đều thấy trong đối tượng này. Theo nghiên cứu của nhiều nước cũng như Việt Nam, tài liệu đăng trên công trình nghiên cứu Khoa học kỹ thuật Thú y (1990-1991) cho thấy có tới hàng chục loài và nhóm loài: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Absidia* sp., *Alternaria* vv... và hàng chục giống thuộc loài *Aspergillus* như *A. flavus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. glaucus*, *A. fumigatus* vv... Sự phân biệt giữa các loài, giống nấm mốc cũng không quá phức tạp và có thể mô

phỏng hình thái, màu sắc và qua tiêu bản được xem trên kính hiển vi cũng đã phân biệt được khá đầy đủ. Một số loài chính đã được mô tả như sau:

1. Absidia: Sợi nấm mọc cao lên trong không khí, màu trắng xám, hình thành rễ phụ (rhizoi) trên môi trường hoặc trong cơ chất, có bào tử kín (sporangiospore), bào tử hình quả lê (pear shape), bong hình bán cầu đại diện là *Absidia corymbifera* có mặt trong đất, ngũ cốc, rau quả, các loại thực phẩm chế biến từ hoa quả.

2. Alternaria: Khuẩn lạc mọc trên môi trường có màu xanh xám, bào tử và cuống bào tử có màu tối, cuống bào tử không chẻ đôi, ngắn. Bào tử trần (conidi) tạo thành chuỗi phân chia hay không phân chia, màu tối, dài hình elip hay oval. Đại diện là *Alternaria alternata* (*A. tenuis*), làm hư hỏng lương thực, thực phẩm và các nguyên vật liệu khác.

3. Aspergillus: Giá conidi mọc trực tiếp trên sợi, hình thành bong (head or vesical) ở đầu mút cuối sợi. Bào tử trần (conidi) hình thành trực tiếp trên các lớp thể bình có 1 hay 2 lớp (metular or sterigmata). Khuẩn lạc có nhiều màu sắc khác nhau; chủ yếu là màu xanh, xanh lá cây, xanh da trời, xanh vàng, xanh nâu, vàng lục, vàng nâu, đen, vàng chanh. Bào tử trần xếp thành từng chuỗi. Ngoài bào tử trần ra, ở một số loài còn hình thành các nang bào tử (Ascospore). Đại diện cho *Aspergillus* theo Raphe và Fennell (1965) có tới 18 nhóm bao gồm 132 loài, có 3 loài sau đây là rất quan trọng:

- *Aspergillus flavus* - oryzac: nhóm loài này có 2 loài quan trọng là *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* sản sinh ra Aflatoxin.

- *Aspergillus niger*: làm hư hỏng lương thực và thực phẩm, được sử dụng trong công nghiệp chế biến thực phẩm vì hình thành nhiều loại axit hữu cơ và các enzym.

- *Aspergillus glaucus*: nhóm này thuộc loại chịu được khô, có thể làm hư hỏng lương thực và thực phẩm kể cả khi đã làm khô.

4. *Pullularia (Aureobasidium)*

Sợi nấm màu tối khi già, sau đó chuyển dần sang màu đen, bào tử màu đen, hình oval không có vách. Có mặt trong đất, trên thực vật, hoa quả, làm hư hại các sản phẩm nông nghiệp.

5. *Cladosporium*: Khuẩn lạc dày màu xanh oliu tới màu xanh xám, mặt phía sau màu đen nâu tới màu đen xanh ở giữa và đỉnh của sợi nấm có thể chẻ nhánh, bào tử trần màu tối, có 1 hay 2 vách ngăn, hình oval tới hình trụ. Đại diện là loài *Cladosporium herbarum* làm hư hỏng lương thực, thực phẩm và các chất hữu cơ khác.

6. *Epicoccum*: Giá bào tử ngắn, màu tối, bào tử màu tối, hình tròn, có 1 hay nhiều vách ngăn. Đại diện là *Epicoccum puprascentis* (*E. rubrum*) có mặt trong thực vật, giấy ẩm, các sản phẩm dệt.

7. *Fusarium*: Sợi nấm có màu sáng tới màu hồng, cuống bào tử đơn giản, ngắn, sự phân nhánh không đều, tiểu bào tử là một tế bào đơn độc hình oval, có thể xếp thành chuỗi, đại bào tử hình quả bồ kết, hình lưới liềm, có nhiều vách ngăn. Loại này có mặt trong lương thực, thực phẩm, thức ăn gia súc; sống hoại sinh và ký sinh; hình thành nhiều loại độc tố quan trọng đối với chăn nuôi gia súc và gia cầm.

8. *Mucor*: Giá bào tử có thể phân nhánh ít hay nhiều, phần cuối của cuống bào tử phình lên tạo thành bông hay trụ (Columella). Bào tử kín (Sporangio spore) hình cầu hoặc hơi dài, trơn. Có một số loại đại diện như *Mucor hiemalis*, thường có mặt trong đất, trong các sản phẩm thực vật. *Mucor plumbeus* có trong đất, phân, ngũ cốc. *Mucor racemosus* có ở trong đất, gây bệnh cho gia súc.

9. *Neurospora (Monilia)*: Bào tử trần, mặt tế bào hình trụ, hình thành chuỗi ở phần cuối cuống bào tử. Đại diện là *N.crassa* và *N.sitophila*, có mặt trên bánh mỳ ẩm hoặc lên men thối.

10. *Paecilomyces (byssochlamys)*: Thể bình hình chai, cuống bào tử mọc trực tiếp trên hệ sợi nấm, bào tử trần xếp thành chuỗi, một tế bào. Đại diện là *P. varioti*, có trong đất, hoa quả, nước lên men hoa quả, giấy da và các chất khác. Hai loài *Byssochlamys fulva* và *B. nivea* gây hư hại đối với nước hoa quả và các sản phẩm từ hoa quả.

11. *Penicillium*: Cuống bào tử tận cùng tạo thành búi, ít hay nhiều nhánh, bên trên tạo thành các thể bình. Khuẩn lạc phần lớn có màu xanh, bào tử trần thành chuỗi dài. Bào tử túi được hình thành. *Penicillium* rất phong phú về loài. Theo Thom và Raper (1949) thì *Penicillium* được chia thành 41 nhóm (series) và hợp thành 4 khóa

a) *Monoverticillata*: Cuống bào tử không phân chia thành nhánh, hình thành độc tố. Đại diện là *Penicillium citreoviride*, *P. prequantans*, *P. spinulosum*

b) *Asymmetrica*: Cuống bào tử phân nhánh về một phía, hình thành độc tố. Đại diện là *P. brevicompactum*, *P. camemberti*, *P. notatum*, *P. citrinum*, *P. claviforme*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* v.v... ,

c) *Biverticillata*: Cuống bào tử phân nhánh cả về hai phía đều đặn, đối xứng. Đại diện là *P. islandicum*, *P. purpurogerum*, *P. rubrum*, *P. rugulosum* v.v...

d) *Polyverticillata*: Cuống bào tử phân chia thành nhánh nhiều lần đối xứng hoặc không đối xứng. Có mặt trong nhiều loại sản phẩm nông nghiệp, công nghiệp, ngũ cốc, hoa quả. Sản sinh nhiều loại độc tố quan trọng có hại đối với chăn nuôi.

12. *Phialophora*: Sợi nấm màu tối, khi già cuống bào tử màu tối, ngắn, thể bình rất khác nhau, bào tử trần, hình oval, một tế bào. Đại diện là *Phialophora fastigiata* và *P. hoffmanii*.

13. *Rhizopus*: Sợi nấm phân nhánh và thành tấm, hình thành rễ phụ: cuống bào tử mọc trực diện ngay trên "gốc". Nang bào tử có màu đen, có trụ ở đầu sợi, vỏ nang bào tử dễ vỡ. Bào tử kín hình tròn hay hình oval.

Trong trạng thái khô có thể tồn tại được lâu dài. Đại diện là *Rhizopus stolonifer*. Có mặt ở các loại hoa quả, bánh mì, rau. *Rh. oryzae* có mặt ở các vùng nhiệt đới và á nhiệt đới, vùng Đông Nam Á. *Rh. microsporus* được sử dụng trong công nghiệp lên men đậu tương

14. *Scopulariopsis (Microascus)*: Cuống bào tử phần lớn phân nhánh, phần trên có một nhóm thể bình, bào tử trần có màu nâu vàng (không bao giờ có màu xanh như *Penicillium*), một tế bào hình tròn thành chuỗi. Đại diện là *S. brevicaulis* có trong các loại thực vật, gây bệnh cho người. *S. fusca* có trong đất, rơm và các chất khác gây bệnh cho con người.

15. *Sporotrichum*: Cuống bào tử phần lớn không phân nhánh, đồng đều, bào tử không có màu sắc, một tế bào hình quả lê, hình thành trên đầu nút mỗi sợi. Đại diện là *S. carnis* làm hư hại thịt ướp lạnh.

16. *Thammidium*: Cuống bào tử mang nang lớn bào tử ở đầu chót và phần dưới cuống của sợi phân nhánh.

17 *Trichodema*: Cuống bào tử phân nhánh rất mạnh, thể bình hình chai đứng riêng lẻ thành từng nhóm bào tử màu xanh sáng, một tế bào, kết thành điểm tâm nhỏ, khuẩn lạc

màu xanh sáng. Đại diện là *T. lignorum* và *T. viride*, có mặt trong đất, gỗ mục và giấy.

18. *Trichothecium*: Cuống bào tử dài, đơn giản, có vách ngăn, bào tử dính trên đầu cuống đơn lẻ hoặc thành nhóm, nhưng không thành chuỗi. Bào tử thường có 2 tế bào, màu sáng hình elíp, đại diện là *T. roseum*, có mặt trên gỗ, giấy, hoa quả, rau, các sản phẩm lên men.

19. *Sporendonema (wallemia)*: Khuẩn lạc có màu nâu tới màu vàng cam.

Một số nấm mốc thường thấy trong thức ăn chăn nuôi và nguyên liệu thức ăn chăn nuôi ở miền Bắc Việt Nam (Kết quả nghiên cứu từ 1986 - 1991, Bộ môn VSTY):

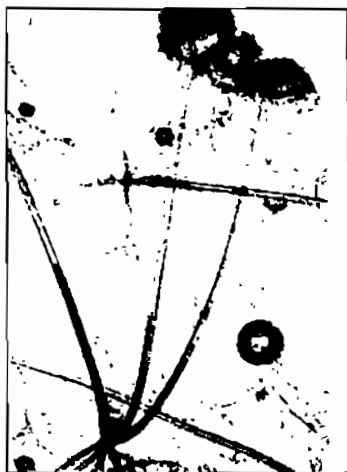
- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| 1. <i>Aspergillus</i> sp. | 7. <i>Penicillium</i> sp. |
| 2. <i>Mucor</i> sp. | 8. <i>Rhizopus</i> sp. |
| 3. <i>Absidia</i> sp. | 9. <i>Fusarium</i> sp. |
| 4. <i>Syncephalustrum</i> sp. | 10. <i>Geotriticum</i> sp. |
| 5. <i>Alternaria</i> sp. | 11. <i>Trichothecium</i> sp. |
| 6. <i>Pullularia</i> sp. | 12. <i>Cladosporium</i> sp. |

Một số loài thuộc *Aspergillus* sp.

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 1. <i>Aspergillus flavus</i> | 7. <i>Aspergillus nidulans</i> |
| 2. <i>Aspergillus fumigatus</i> | 8. <i>Aspergillus ustus</i> |
| 3. <i>Aspergillus ochraceus</i> | 9. <i>Aspergillus wenti</i> |
| 4. <i>Aspergillus niger</i> | 10. <i>Aspergillus sidowi</i> |
| 5. <i>Aspergillus candidus</i> | 11. <i>Aspergillus parasiticus</i> |
| 6. <i>Aspergillus glaucus</i> | 12. <i>Aspergillus oryzae</i> |



Mucor racemosus



Fusarium sp. Đại và tiểu bào tử
(*Macroconidi* & *Microconidi*)



Aspergillus fumigatus



Rhizopus sp.

Hình 1.1: Một số loại nấm mốc thường gặp trong các thức ăn
và nguyên liệu thức ăn chăn nuôi

Bảng 1.8: Một số loài thuộc *Aspergillus* được phát hiện
(Kết quả nghiên cứu 1991 - Bộ môn VSTY)

TT	Loại thức ăn và nguyên liệu	Số lượng mẫu	Tỷ lệ nhiễm (%)				
			A.flavus	A.glaucus	A.niger	A.fumigatus	A.ochraceus
1	Ngô hạt	65	76	30	38	38	15
2	Ngô bột	60	83	50	33	33	33
3	Sắn lát	50	62	58	50	10	-
4	Bột sắn	60	60	60	60	20	-
5	Bột cá	50	20	50	50	50	10
6	Khô dầu lạc	70	54	50	21	14	7,1
7	Đậu tương hạt	32	75	25	25	50	-
8	Đậu tương bột	32	75	25	25	50	-
9	Cám gạo	25	48	100	-	48	-
10	Cám ép	31	32	29	62	82	12
11	Cám tổng hợp cho lợn	60	50	33	33	36	16
12	Cám tổng hợp cho gà đẻ	30	66	33	33	36	16
13	Cám tổng hợp cho gà con	30	36	66	33	66	33
	Cộng	648	55%	46%	43%	35%	8%

Bảng 1.9: Một số giống nấm mốc trong các nguyên liệu thức ăn chăn nuôi
(Kết quả nghiên cứu 1991 - Bộ môn VSTY)

STT	Loại thức ăn	Số lượng mẫu	Tỉ lệ nhiễm các loại nấm mốc					
			Aspergillus	Penicillium	Absidia	Mucor	Rhizopus	Fusarium
1	Ngô hạt	65	100	58	53	23	7	15
2	Ngô bột	60	100	50	83	33	3	-
3	Sắn lát	50	100	60	40	-	40	-
4	Bột sắn	60	100	70	30	70	20	-
5	Bột cá	50	100	70	30	70	20	-
6	Khô dầu lạc	70	100	42	50	7	7	5
7	Đậu tương hạt	60	50	50	-	33	10	-
8	Đậu tương bột	60	60	50	-	33	10	-
9	Cám gạo	25	100	75	25	25	-	-
10	Cám ép	25	100	48	24	-	-	-
11	Cám tổng hợp cho lợn	30	100	50	62	25	3	7
12	Cám tổng hợp cho gà đẻ	30	100	50	66	33	-	-
13	Cám tổng hợp cho gà con	30	100	66	33	6	6	-
	Cộng	648	91%	54%	39%	18%	12%	3%

1.3. ĐỘC TỔ NẤM MỐC VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA NÓ VỚI VẬT NUÔI

1.3.1. Độc tố nấm mốc

Cho đến nay, người ta đã phát hiện khoảng 300 chất độc nấm mốc, trong đó có 20 chất độc gây nguy hiểm đối với con người và vật nuôi. Nấm mốc phát triển trên lương thực, thực phẩm đã làm suy giảm hàm lượng các chất dinh dưỡng của cơ chất, còn sản sinh ra các độc tố. Một số ngũ cốc như ngô, lạc, đậu, các loại hạt có dầu thường rất thích hợp cho sự sản sinh độc tố của nấm mốc

Một số độc tố và sự có mặt của chúng ở ngũ cốc:

Độc tố	Ngô	Gạo	Mì
Aflatoxin	+		+
Citrinin	+	+	+
Ochratoxin	+	+	+
Sterigmatocystin	+		+
Zearalenon	+		+
T-2Toxin	+		+
Nivalenon	+		+
Diacetocyclopropanol (DAS)	+		+

Trong những điều kiện thích hợp như nhiệt độ, độ ẩm môi trường, hàm lượng nước trong vật chất và phương thức bảo quản đã tạo điều kiện để nấm mốc phát triển và sinh trưởng,

sản sinh ra độc tố. Ở ngô, khô lạc đã phát hiện thấy hàm lượng Aflatoxin rất cao.

Theo nhiều kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước: hàm lượng Aflatoxin có thể từ 1000ppb tới vài nghìn ppb. Sự có mặt của độc tố nấm mốc trong thức ăn chăn nuôi đã dẫn đến các hậu quả sau:

1. Tăng chi phí thức ăn/1kg tăng trọng
2. Giảm trọng lượng thu được do chậm lớn
3. Tỷ lệ ốm và chết do các bệnh đường tiêu hóa và hô hấp cao.
4. Giảm sức đề kháng với các bệnh truyền nhiễm, đặc biệt là bệnh Newcastle, bệnh Gumboro, bệnh do Salmonella và bệnh cầu trùng (coccidiosis).
5. Giảm sản lượng trứng, giảm tỷ lệ ấp nở. Gây chết phôi và nhiều trường hợp sảy thai, đẻ non.
6. Nếu liều độc tố đủ lớn sẽ gây chết hàng loạt gia súc và gia cầm.
7. Nếu liều không đủ lớn có thể gây ốm, còi cọc, xù lông, vàng da, phân lỏng và dẫn đến chết.
8. Gây tồn dư độc tố trong mô bào và tổ chức làm ảnh hưởng tới sức khỏe người tiêu dùng do ăn phải chất độc tồn dư trong thịt, trứng, sữa và phủ tạng.

Cho đến nay, các nhà khoa học đã biết được đầy đủ các đặc tính sinh học và độc tính của nhiều loại độc tố khác nhau. Nhiều loại nấm mốc có thể sản sinh ra cùng một độc tố.

Bảng 1.10: Một số độc tố nấm mốc và nấm mốc sinh độc tố

1	Aflatoxin B ₁ , B ₂ Aflatoxin G ₁ , G ₂	Aspergillus flavus và A. parasiticus
2	Patulin	Aspergillus clavatus, A. terreus, Penicillium patulum, P. claviforme, P. expansum...
3	Ochratoxin	Aspergillus ochraceus, A. alliaceus, Penicillium viridicatum, P. ostianus...
4	Citrinin	Aspergillus candidus, A. terreus, Penicillium citrinum, P. expansum...
5	Zearalenol	Fusarium roseum, F. equiseti, F. gibbosum, F. moniliforme, F. nivale...
6	Moniliformin	Các chủng thuộc Fusarium
7	T-2 Toxin và Diacetoxyscirpenol	Fusarium tricinctum, F. solani, F. equiseti, F. graminearum...
8	Alternarial	Alternaria alternata
9	Sporidesmin	Phytophthora blight
10	Fumatoxin	Aspergillus fumigatus
11	Sterigmatocystin	Aspergillus nidulans, A. ustus, A. versicolor
12	Nivalenol	Fusarium nivale
13	Vomitoxin	Fusarium graminearum, F. roseum
14	Islatravir	Penicillium islatravir

Nhiều độc tố cũng đã được nghiên cứu và xác định độc tính (bảng 1.11). Có thể chia độc tố nấm mốc thành 6 nhóm khác nhau, dựa trên tính chất gây độc, tổ chức bệnh lý và sinh học.

**Bảng 1.11: Tính chất lý và hóa học
của một số độc tố nấm mốc**

Tên độc tố	Công thức	Trọng lượng phân tử	Điểm nóng chảy	Dung môi hòa tan	Dung môi hấp thụ	Bước sóng hấp thụ
Aflatoxin B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268 269	Rượu Axeton Cloroform	Ethanol	223 265 362
Aflatoxin B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	314	287	nt	Methanol	220 265 363
Aflatoxin G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	330	244 246	nt	Ethanol	243 257 264 362
Aflatoxin G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	230	nt	Methanol	217 245 365
Aflatoxin M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	229	nt	Ethanol	226 265 357
Ochratoxin A	C ₂₀ H ₁₆ O ₆ HN	403	169	Rượu Nước	Methanol	215 333
Citrinin	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	205	175		Ethanol	222 253 319
Sterigmatocystin	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	324	246	Clorformpyridin	Ethanol	208 235 329
Palrelin	C ₇ H ₆ O ₄	154	110 111	Rượu, Cloroform Axeton nước	Methanol Ethanol	276 275
Zearalenol	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318	164 165	Benzen, Ete Cloroform		236 274 316
T-2 Toxin	C ₂₄ H ₂₆ O ₈	446	151 152	Clorform Rượu		
Diacetoxyscirpenol	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366	162 164	nt		
Deoxynivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	151 153	Rượu Nước	Ethanol	218

Bảng 1.12: Ảnh hưởng của độc tố nấm mốc đối với các cơ quan trong cơ thể

TT	Đối với cơ quan nội tạng	Độc tố tác động
1	Gây ung thư gan	Aflatoxin, Patulin, Sterigmatocystin, Luteoskyrin (Islantoxin), Penicillin axit
2	Độc với gan	Aflatoxin, Ochratoxin, Rubratoxin, Luteoskyrin
3	Độc với thận	Ochratoxin, Citrinin
4	Độc với các cơ quan sinh dục	Zearalenol và một số các Trichothecen
5	Độc với thần kinh	Esgotamin, Citreoviridin
6	Độc với da và niêm mạc	T-2 Toxin, Diacetocyscirpenol, Nivalenol, Deoxynivanenol, Sporidesmin

Một vài độc tố có thể ảnh hưởng đến nhiều cơ quan tổ chức khác nhau như Aflatoxin. Aflatoxin là độc tố được biết đến là tác nhân gây ung thư gan, nhưng còn có tác hại đối với thận và nhiều tổ chức khác của cơ thể gây suy giảm miễn dịch.

Bảng 1.13: Độc tính của một số độc tố nấm mốc đối với động vật thí nghiệm (LD_{50} - mg/kg trọng lượng)

Độc tố	Vịt con	Chuột nhắt	Chuột cống	Lợn con	Gà con
Aflatoxin B ₁	0,36	9	0,56	0,26	6,5-16
Aflatoxin B ₂	1,7	—	—	—	—
Aflatoxin G ₁	0,78	—	—	—	—
Aflatoxin G ₂	3,45	—	—	—	—
Citrinin	—	35	47	—	—
Ochratoxin A	0,5	—	32	6,0	3,4
Palrelin	—	35	15	—	—
Diacetoxyscirpenol	—	23	0,75	—	—
Moniliformin	—	20,9-29,1	—	—	—
Deoxynivalenol	—	70-76	—	—	—
Zearalenol	—	3,04	4	1,21	40
T-2 Toxin		> 500	> 5490		

1.3.2. Một số độc tố nấm và ảnh hưởng của chúng đối với vật nuôi

1.3.2.1. Esgotin

Esgotin là độc tố của nấm *Claviceps purpurea*, nấm ký sinh trên các loại hạt ngũ cốc như yến, mạch, mì, trên cỏ Ovary

hình thành các đám khuẩn lạc màu tối xám, nấm mốc sản sinh ra các hạch nấm gọi là *Seleatoria esgotin* có 3 độc tố chính là esgotamin, esgotoxin và esgometin.

Tác động của esgotin chính là lên hệ thần kinh làm cho con vật thở nhanh, mạch nhanh, hôn mê và có thể bị liệt

Tác động khác là làm cho con vật bỏ ăn, ăn ít thức ăn.

Esgotin ảnh hưởng đến sự sinh sản và phát triển của con nai, ở lượng 0,3-1% của *Seleatoria* trong thức ăn có thể làm cho lợn nai sinh sản kém, trọng lượng sơ sinh bị giảm, tỷ lệ nuôi sống cũng giảm - lợn có thể bị mất sữa trong thời kỳ này. Có tới 50% đàn bị ảnh hưởng. Esgotin làm ngăn cản quá trình hình thành prolactin trong giai đoạn cuối của thời kỳ có sữa. Nhiều nghiên cứu thí nghiệm chứng minh rằng Esgotin không làm cho lợn nai bị sẩy thai trong thời kỳ có sữa.

1.3.2.2. *Fusariumtoxin*

Fusariumtoxin là một nhóm lớn các độc tố thuộc nấm *Fusarium* - có mặt trong vùng khí hậu lạnh Châu Âu hơn là các nước khác.

Nhóm chính trong các độc tố của *Fusarium* là *Trichothecens* và *Zearalenol*.

+ *Trichothecens*:

Trichothecens có nguồn gốc từ nhiều loài nấm như *Calonectria*, *Gibberella*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*,

Cephalosporium trong đó 1/2 là thuộc Fusarium Trichothecenes với đại diện chính là T-2 Toxin và Diacetocyclopentenol (DAS).

a) Ảnh hưởng của T-2 Toxin và DAS đối với vật nuôi

T-2 Toxin và DAS ảnh hưởng lớn đến các vật nuôi đặc biệt là lợn và gia cầm.

*** Ảnh hưởng đối với lợn**

T-2 Toxin và DAS gây kích ứng lên da làm cho con vật khó chịu. Ở lượng độc tố cao có thể dẫn đến sự hủy hoại da, DAS và T-2 Toxin cũng gây giảm bạch cầu, viêm dạ dày và ruột, yếu cơ tim, làm sảy thai và giảm khả năng tái tạo máu. Lợn ăn phải thức ăn có chứa T-2 Toxin hoặc DAS có thể dẫn tới giảm trọng lượng, đi ỉa chảy, bỏ ăn hay ăn ít và gây nôn mửa.

*** Ảnh hưởng với gia cầm**

- Đối với gà con và gà dò: T-2 Toxin trong thức ăn đã làm giảm sinh trưởng và phát triển. Dấu hiệu bệnh lý đặc trưng là xuất hiện các tổn thương như mụn nước ở đùi và chân, niêm mạc miệng bị loét và bao phủ bởi lớp keo dày giống như casein. Cũng giống như T-2 Toxin, Neosolaniol, Verrucarol, Fusarenol-x có trong thức ăn chăn nuôi gây rối loạn tiêu hóa, giảm phát triển, lông xù, rối loạn trao đổi sắc tố và thần kinh.

- Đối với gà mái đẻ: sản lượng giảm sút, một đàn gà đang đẻ gồm 2.800 con bị nhiễm DAS và T-2 Toxin trong

thức ăn đã làm giảm sản lượng trứng từ 2.423 quả còn 150 quả. Gà mái đẻ cũng giảm tăng trọng do giảm thức ăn, ỉa chảy và mào xanh tím. Nếu kéo dài quá trình nhiễm độc DAS và T-2 Toxin trong thức ăn sẽ dẫn đến tình trạng buồng trứng thoái hóa và teo giảm. Trứng đôi khi bị teo vỏ, trên mặt vỏ xuất hiện lớp phấn vôi màu vàng. Niêm mạc miệng bị loét, phủ một lớp màu vàng, lớp bọt khô dày làm thức ăn cộm lên khiến con vật khó có thể khép miệng lại. Lông trở nên xơ, thô, kém bóng mượt.

Gan ở những con vật có tổn thương ở miệng trở lên có màu vàng, thận sưng to chứa đầy urat (muối urat), thẩm dịch màu vàng, loét cục bộ ở niêm mạc miệng. Trong mề xuất hiện các gò thô dày. Phân tích thức ăn có tới 3mg T-2 Toxin/kg.

- Đối với ngỗng và vịt

Ngỗng và vịt ăn phải thức ăn có chứa T-2 Toxin đã gây ra các triệu chứng bỏ ăn, nước uống nhiều và giảm vận động.

Niêm mạc thực quản thoái hóa, hình thành màng giả niêm mạc, đường tiêu hóa trên thoái hóa nặng, lớp biểu mô đường tiêu hóa cũng bị thoái hóa, nhiều chỗ viêm và phù nề, tế bào biểu mô ống thận bị thoái hóa

b) Cơ chế tác động của Trichothecens với vật nuôi

Phần lớn các Trichothecens độc với da, gây những tổn thương thẩm dịch đối với lớp niêm mạc miệng, dần dần

chuyển thành màu vàng xám. Các tổn thương phía dưới lớp niêm mạc gây loét, đặc biệt là loét ở lớp dưới gần tuyến nước bọt thông ra lưỡi và vòm miệng. Chất dịch tiết ra dọc theo bờ và viền mép phía bên trong mồm - giải phẫu tổ chức bệnh lý cho thấy sự hủy hoại lớp biểu mô dưới lớp niêm mạc, loét và dịch rỉ viêm cùng với các tế bào bạch cầu, tế bào viêm tạo thành lớp màng dày của dịch tiết, xác vi khuẩn, khuẩn lạc vi khuẩn và cả thức ăn.

T-2 Toxin và DAS có tác động gần giống nhau, có thể gây ngộ độc cấp tính và mãn tính. Trong các trường hợp ngộ độc thường thấy sự hủy hoại các tổ chức và cơ quan tạo máu xuất hiện rất sớm. Sau một vài giờ trúng độc đã có sự suy giảm các tế bào bạch huyết, nhưng sự phục hồi lại xảy ra nhanh chóng sau 72 giờ. Song song với sự suy giảm các tế bào máu là hiện tượng chảy máu, túi mật viêm, biểu mô ống mật bị giãn, biểu mô đường tiêu hóa cũng bị hủy hoại, lớp niêm mạc dạ dày và lớp biểu mô của chân lông con vật tăng quá trình phân giải và dẫn đến cái chết.

Nhiễm độc mãn tính làm suy giảm trọng lượng cơ thể, biến đổi chất sắc tố, thiếu máu, lông xơ và thô, các mô tạo bạch huyết bị teo lại, tủy xương có màu đỏ nhạt hay màu vàng, gan có màu vàng, đôi khi chảy máu gan. Giải phẫu bệnh lý cho thấy sự suy thoái và hoại tử các tổ chức tạo máu, tế bào gan và ống mật, niêm mạc đường tiêu hóa, lớp biểu mô

của gai chân lông. Gan thoái hóa dạng thoái hóa không bào, thoái hóa mỡ. Ống mật dẫn, tuyến giáp trạng bị teo lại, có chứa các chất keo xám và các tế bào biểu mô khổng lồ.

Nhiễm độc T-2 Toxin còn gây ra các mảng casein hóa ở đường tiêu hóa phía trên, đặc biệt là ở miệng và hầu. Ở vịt còn phát sinh các triệu chứng và bệnh tích như giãn thực quản, mề đầy ra, loét phần dưới lớp niêm mạc, teo các cơ quan tạo máu.

* Sinh sản và đẻ trứng: T-2 và DAS làm giảm sút tỷ lệ đẻ trứng ở gà Leghorn do giảm thức ăn thu nhận, giảm tăng trọng. Tỷ lệ ấp nở và chất lượng gà cũng bị giảm sút đáng kể. Hiệu quả sử dụng thức ăn kém.

* Miễn dịch: Các Trechothecens đều gây hiện tượng suy giảm miễn dịch do chúng tác động đến các cơ quan hình thành miễn dịch như hạch, tủy xương. Tuy nhiên cũng chưa có nhiều bằng chứng chứng minh sự suy giảm miễn dịch ở gà Leghorn và gà Tây

* Độc với thần kinh: T-2 Toxin ảnh hưởng đến cơ quan thần kinh, làm mất thăng bằng và các hoạt động phản xạ chính xác khác bị ảnh hưởng. Tuy nhiên cũng chưa có nhiều thí nghiệm chứng minh.

* Sự đào thải tồn dư: Gan là cơ quan phân giải và bài xuất đối với T-2 Toxin. Sau 4 giờ ăn phải thì lượng T-2 Toxin là cao nhất ở gan, ở mật và ruột là sau 12 giờ. 82% T-2 Toxin

được bài xuất ra khỏi cơ thể sau 48 giờ, T-2 Toxin còn có thể thấy trong trứng, chất thải của T-2 Toxin thường qua đường tiêu hóa, qua phân. Người ta thấy đồng phân của T-2 Toxin qua phân là HT-2 toxineosolaniol, T-2 tetraol và 8 chất phân giải không xác định khác, khoảng 0,17% T-2 Toxin xâm nhập qua trứng.

1.3.2.3. Zearalenon (F-2 Toxin)

Zearalenon là độc tố của Fusarium, ảnh hưởng mạnh đến sinh sản và phát dục của lợn và gia cầm.

a) Đối với lợn

Triệu chứng bệnh lý khác nhau theo lứa tuổi, ở lợn cái hậu bị nếu được ăn thức ăn có 1-5 ppm đã có thể nhanh chóng gây viêm đường sinh dục, phù âm hộ và âm đạo, hiện tượng đau buốt ở các bộ phận sinh dục là rất phổ biến. Lợn nái hậu bị ăn phải thức ăn có 2 ppm trong 90 ngày có thể phát triển bình thường, không có sự thay đổi giới tính và không ảnh hưởng đến chức năng sinh sản. Ảnh hưởng của lợn cái hoàn toàn khác với lợn nái hậu bị. Ở lượng 3 -10 ppm có thể gây mất động dục ở lợn nái nếu như ăn chất độc trong chu kỳ động dục. Tác động gây ức chế động dục là do thiếu progesteron trong máu. Nhiễm độc Zearalenon dẫn đến sảy thai ở cuối giai đoạn thứ 2 của chu kỳ 3 tháng, nhưng cũng rất khác nhau, tùy thuộc vào progesteron từ thể vàng. Nhiễm độc tố Zearalenon ở lợn mẹ làm cho lợn con có thể bị nhỏ hơn, đặc

biệt là bào thai bị giảm kích thước ở giai đoạn trước khi bám vào cổ tử cung thường 7 -10 ngày sau khi thụ thai và khả năng sống sót rất mỏng manh, khó tồn tại được đến ngày thứ 21.

Lợn con sinh ra từ lợn mẹ được ăn thức ăn có Zearalenon xuất hiện những triệu chứng bệnh lý như phình to cơ quan sinh dục bên ngoài và tử cung bên trong. Ở lợn đực bao quy đầu phình to, lợn đực hậu bị có thể giảm phát triển tinh dục và tăng kích thước tinh hoàn. Lợn trưởng thành hầu như không bị ảnh hưởng của Zearalenon, thậm chí liều tới 200 ppm.

b) Đối với gà đẻ

Gà đẻ ăn thức ăn có chứa Zearalenon đã làm giảm tỷ lệ đẻ trứng, trứng không đồng đều và chất lượng xấu, tỷ lệ ấp nở giảm thấp. Nhiều gà đẻ không đẻ được là do sự tồn tại của các lòng đỏ trong đường dẫn trứng. Ống dẫn trứng bị casein hóa do viêm mãn tính. Mức progesteron trong huyết thanh giảm thấp nhưng estradiol không bị ảnh hưởng. Thí nghiệm Zearalenon trên gà Tây cho thấy gà Tây mắn cảm hơn, đường sinh dục cũng như các cơ quan sinh dục chịu tác động của hormone bị ảnh hưởng. Liều lượng từ 100-800 mg/kg trong khẩu phần hoặc 5mg/kg trọng lượng hoặc 19 mg/gà.

* Bệnh lý: Quá trình nhiễm độc làm tăng trọng lượng túi Bursa fabricius, trứng rơi vào màng xoang bụng, ống dẫn trứng phình to có vách mỏng và chứa đầy thể dịch. Gà dò có

sức chịu đựng tốt với Zearalenon, vỏ trứng gà dày lên, chất lượng trứng giảm sút, giảm tỷ lệ đẻ trứng.

* Miễn dịch: Bạch cầu giảm và chủ yếu giảm lympho. Không có sự thay đổi các thông số máu, protein tổng số, canxi (Ca), photpho (P), photphatasa kiềm và cholesterol.

* Đào thải: Zearalenon phân bố chính là ở gan và mật, bài tiết chủ yếu qua phân; cơ, mỡ bụng, da đều có hàm lượng tồn dư rất ít. γ và β Zearalenon được thấy ở gan và phân. Zearalenon còn thấy ở huyết tương, phổi, tim, gan và thận. Tỷ lệ (%) của Zearalenon là tùy theo thời gian. Cả γ Zearalenon và β Zearalenon đều ở trạng thái sulfat hoặc glucuronid.

Ở gà Leghorn, 94% Zearalenon được bài tiết ra phân sau 72 giờ, 1/3 chất được xác định là Zearalenon - 1/3 khác là chất đồng phân. Lòng đỏ trứng có chứa Zearalenon sau 72 giờ cho ăn, cơ không tồn dư Zearalenon sau 72 giờ.

1.3.2.4. Ochratoxin

Ochratoxin là độc tố với thận.

a) Đối với lợn

Trong thức ăn có chứa 1 ppb gây ra giảm trọng lượng, khát nước và hiệu quả thức ăn bị giảm thấp. Liều thấp 200 ppb trong nhiều tuần lễ đã gây ra những tổn thương ở thận. Triệu chứng khác là lợn ỉa chảy, bỏ ăn, thận cứng và xám lại khi mổ.

Những thay đổi bệnh lý khác bao gồm urê máu, protein huyết thanh, tăng men chuyển hóa amin, làm tăng lượng Glacyl và protein niệu.

Ochratoxin, citrinin và axit penicillic gây ra viêm thận mang tính chất thoái hóa các ống góp do quá trình phát sinh các sợi kẽ mô, gan hủy hoại dạng thoái hóa mỡ, loét dạ dày và các tổn thương khác trong trường hợp bệnh kéo dài.

Chẩn đoán bằng cách phân tích Ochratoxin trong thức ăn và trong thận tươi.

b) Ochratoxin ở gia cầm

Ochratoxin trong thức ăn làm giảm tăng trọng, giảm hiệu quả chuyển hóa thức ăn ở gia cầm, trao đổi sắc tố bị rối loạn.

Gà nhiễm độc Ochratoxin dẫn đến đi ỉa chảy, phân có nhiều urat, vỏ trứng có phủ phần màu vàng. Trong thức ăn tự nhiên của gà có chứa Ochratoxin A,B và C theo tỷ lệ 90:8:2, vì vậy ít tìm thấy Ochratoxin B và C trong mẫu phân tích.

*** Bệnh thực nghiệm ở gà**

Ochratoxin gây bệnh chủ yếu cho thận nhưng cũng có ảnh hưởng đến gan, đến miễn dịch và tạo máu. Nhiễm độc Ochratoxin cũng ảnh hưởng xấu đến các bệnh truyền nhiễm khác như bệnh Gumboro hoặc bệnh cầu trùng.

Triệu chứng bệnh biểu hiện sự giảm hoạt động tự nhiên và nhiệt độ cơ thể. Liều á cấp tính có thể làm giảm các thông số

phát triển: trọng lượng, tiêu tốn thức ăn, rối loạn trao đổi sắc tố, sản lượng trứng, chất lượng và tỷ lệ ấp nở.

*** Bệnh tích:**

Liều chết cấp tính gây ra các tổn thương ở gan, tụy và thận. Thận sưng to có chứa các chất urat màu trắng trong niệu quản, trong thận, tim, cơ tim, gan và lách.

Những thay đổi bệnh lý giải phẫu chính là viêm thận ống cấp tính dạng trụ protein và trụ urat. Viêm và thoái hóa cục bộ biểu mô ống lượn, ở một số bệnh phẩm có thoái hóa không bào, bào tương, thoái hóa cục bộ tế bào gan, các hốc chứa sợi huyết - cơ quan tạo máu bị hủy hoại, giảm bạch cầu trong lách và túi Fabricius.

Liều gây chết á cấp ở gà Tây, vịt và gà dò làm tăng trọng lượng gan, thận và giảm trọng lượng cơ quan tạo bạch cầu. Thận có màu xám nhạt. Mật có màu xám và nhớt, ruột viêm cata.

Viêm ruột cata liên quan đến sự giảm chất keo, mặc dù viêm đóng vai trò chính. Ở gà dò còn phát sinh hiện tượng mềm xương, giảm kích thước xương chân và xương chày dễ gãy.

Giải phẫu bệnh lý cho thấy sự rối loạn tạo xương, màng nội mô, sự tạo thành xương bị tổn hại và phát triển bệnh lý.

Thay đổi bệnh lý ở thận bao gồm hình thành các trụ ống dẫn, tăng sinh biểu mô ống, các tế bào viêm xuất hiện trong các ống thận của gà và vịt, niêm mạc búi cầu thận dày lên.

Ochratoxin gây thoái hóa không bào ở gan, glucogen tăng trong máu. Ở vịt thoái hóa không bào, cơ chứa nhiều mỡ. Ở chim cú Nhật có hiện tượng dần ống mật, nhân tế bào sưng to, giảm bạch cầu trong các vùng hạch ruột.

Nhiễm độc Ochratoxin mãn tính làm giảm chức năng của thận nhưng không rõ những tổn thương qua giải phẫu bệnh lý, chỉ có tổn thương nhẹ ở ống lượn gần, lượn xa. Tế bào biểu mô sưng lên, sưng tế bào nhân, tăng quá trình phân bào gián phân. Ty lạp thể phát triển thành dạng vòng, tăng lên về kích thước và số lượng của hạt, xuất hiện các hạt mỡ nhỏ trong nguyên sinh chất. Ở gà dò, túi tiểu cầu và màng biểu mô bị dày lên rồi thoái hóa.

* Sinh trưởng và sản xuất trứng

Ochratoxin làm chậm trưởng thành về giới tính, ở gà đẻ sản xuất trứng bị giảm trong vòng 2 tuần. Trọng lượng cơ thể giảm - giảm lấy thức ăn, giảm kích thước trứng, trọng lượng trứng và chất lượng trứng bị giảm, uống nước nhiều, mào xám, có thể chết.

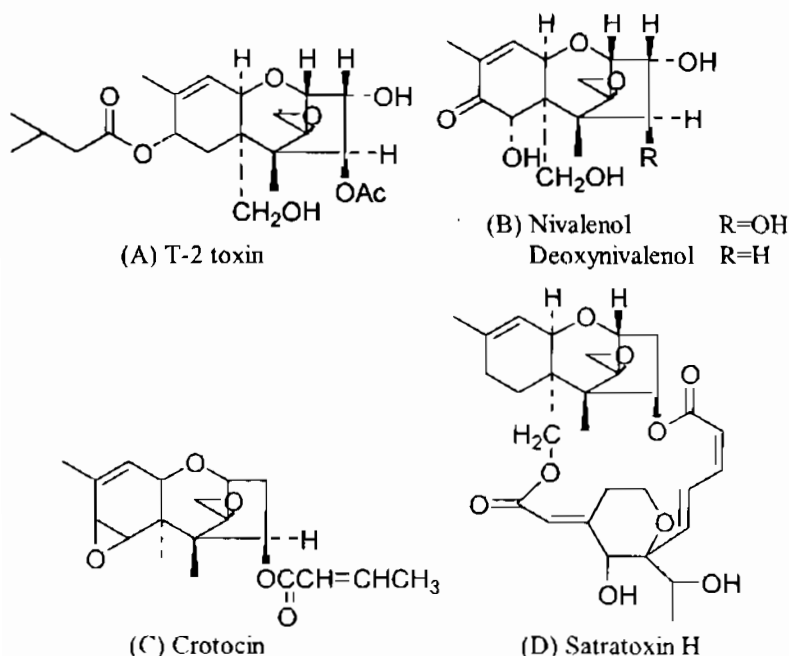
Mổ khám thấy trọng lượng gan, thận không có gì thay đổi về giải phẫu và tổ chức. Ở chim cú có thể làm giảm tỷ lệ ấp nở do chết thai ngay từ ngày đầu. Tỷ lệ ấp nở giảm ở gà Leghorn.

* Miễn dịch: Sự suy giảm miễn dịch là do sự teo giảm đi của tuyến Thymus, cũng như các tổ chức tạo máu đều bị ảnh

hưởng. Miễn dịch tế bào bị giảm đi đối với cả gà dò và gà Tây. Hàm lượng globulin miễn dịch huyết thanh bị giảm. Ochratoxin cũng như Aflatoxin gây ra sự miễn cảm với bệnh truyền nhiễm như Coccidiosis (cần trùng).

* Sinh hóa máu: Làm tăng lượng axit uric trong máu là đặc trưng của nhiễm độc Ochratoxin ở gia cầm: tăng photphataza kiềm, cholinesteraza và tăng sự chuyển hóa glutamin, giảm protein toàn phần, cholesterol, caroten, canxi, photpho, kali và glucoza.

Hình 1.2: Một số độc tố nấm *Fusarium* (Nhóm *Trichothecens*)



* Đào thải và tồn dư: Ochratoxin A phân bố chính ở thận, lượng ít hơn ở gan và cơ. Ochratoxin bị đào thải ra khỏi tế bào biểu mô trong vòng 48 giờ. Ochratoxin có trong lòng đỏ trứng và lòng trắng đã ảnh hưởng đến sự ấp nở. Ochratoxin trong trứng có liên quan đến Ochratoxin có trong thức ăn.

Ochratoxin được đào thải qua mật vào phân và qua nước giải, tồn dư ở gan và thận. Sự có mặt Ochratoxin trong xương là do có hàm lượng cao trong thức ăn. Chất tồn dư chỉ tồn tại trong thời gian ngắn và bị loại thải sau khi ngừng thức ăn có chứa Ochratoxin.

Chương II

NGUỒN GỐC, ĐẶC TÍNH LÝ, HÓA, SINH HỌC VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH XÁC ĐỊNH AFLATOXIN

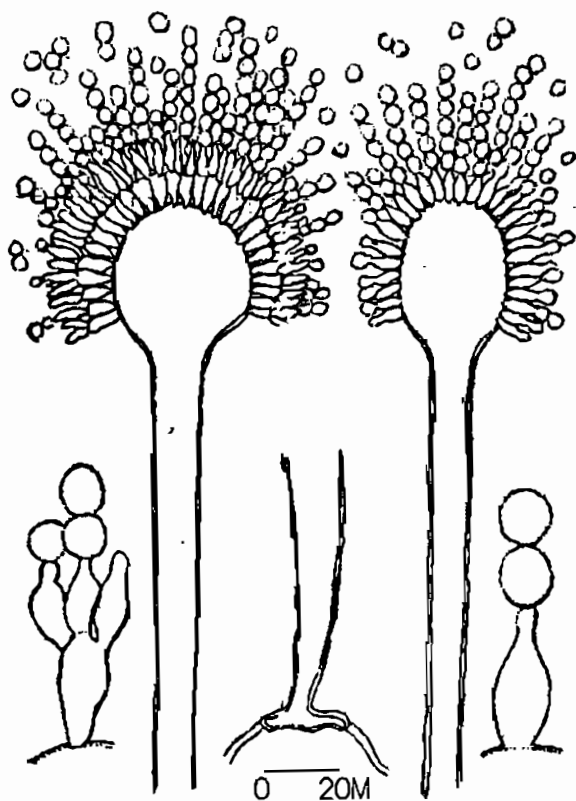
2.1. ASPERGILLUS FLAVUS VÀ ASPERGILLUS PARASITICUS

Aspergillus flavus và *Aspergillus parasiticus* thuộc họ nấm cúc, là loại nấm sản sinh ra Aflatoxin trong tự nhiên và trong môi trường nuôi cấy nhân tạo. Đây là loài nấm khá phổ biến, có thể tìm thấy trên khắp địa cầu, đặc biệt là các nước nhiệt đới. Hai loài nấm này có thể phát triển trên nhiều loại cơ chất, các loại hạt có dầu, thậm chí cả trên bột cá và thịt giàu protein. Thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi là những đối tượng thích hợp nhất cho sự phát triển và sản sinh độc tố.

2.1.1. Hình thái học

Trong tự nhiên, có thể dễ dàng phân biệt được loài nấm này do chúng có màu sắc dễ nhận. Màu vàng lục hay màu xanh lục của đám bào tử khi chín bám trên các mầm của hạt hoặc phát triển trên các kẽ giữa hai phiến của hạt, khi tách ra

có thể nhìn thấy rất rõ. Ở các khe giữa hạt lạc hay lớp mầm của hạt ngô bị mốc có thể quan sát thấy bào tử.



Hình 2.1: Cấu tạo vi thể của *Aspergillus flavus* Link - cơ quan sinh sản bao gồm bông (sterigmata), thể bình 1 lớp và 2 lớp (metular) và bào tử (conidi)

Trên môi trường nuôi cấy nhân tạo, trên thạch Sabouraud hay Czapek Doc hình thành khuẩn lạc sau 24 giờ, khu vực trung tâm có màu vàng nhạt, rìa mép màu trắng mịn. Sau 48 giờ hình thành nhiều bào tử miền trung tâm, xuất hiện các khối bào tử chín, màu vàng nhạt đã chuyển sang màu vàng lục. Từ 72-96 giờ, khuẩn lạc phát triển mạnh và đạt cực đại ở ngày thứ 6-7 khi nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Khuẩn lạc có kích thước tới 4-5 cm, hình thành nhiều vòng tròn đồng tâm đều đặn, thường có 5-6 vòng tròn màu xanh lục trên bề mặt khuẩn lạc, rất dễ phân biệt với nhiều loại nấm mốc khác.

Quan sát đặc điểm vi thể dưới kính hiển vi ở bội số thấp (X16) cũng có thể phân biệt được do cơ quan sinh sản của loại nấm này rất phong phú.

Cơ quan sinh sản có hình hoa cúc. Bọng tròn có kích thước từ 25-45 μm , giá conidi (conidiophores) mọc thẳng từ sợi xù xì có kích thước từ 400-1000 μm ; rộng 5-15 μm . Bào tử trần (conidi) hình tròn hoặc hình ovan, có đường kính từ 2-4 μm . Thể bình có hai lớp (biseries) kích thước từ 10-15 μm và 3-5 μm , đôi khi chỉ có một lớp (hình 1).

2.1.2. Phương pháp phân biệt *A. flavus* trong nhóm *A. flavus oryzae* (Dựa theo khóa phân loại của Thom và Raper, 1945; Raper và Fennel, 1965)

Trong nhóm *Aspergillus flavus oryzae* có 5 loài gồm *Aspergillus oryzae* Cohn, *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus parasiticus* Speare, *Aspergillus micro-virido-citrinus*

Constantin Lucet và *Aspergillus effusus* Tiraboschi. Cả 5 loài này rất dễ nhầm lẫn với nhau về hình thái học, về màu sắc điển hình trên môi trường nuôi cấy: loài *Aspergillus oryzae* Cohn được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp lên men đậu tương, trong công nghiệp sản xuất các men (enzym) phục vụ cho công nghiệp lên men rượu bia, sản xuất thức ăn chăn nuôi, do vậy cần phải được phân biệt để tránh nhầm lẫn với 2 loài *A. flavus* và *A. parasiticus* sản sinh độc tố Aflatoxin.

Cả 5 loài này rất phổ biến trên phạm vi toàn thế giới và chiếm phần đông trong *Aspergillus*. Chúng được biết đến do sự có mặt ở nhiều loại cơ chất khác nhau. Trong công nghiệp lên men của các nước phương Đông: ngũ cốc, sản phẩm chế biến từ lương thực như bánh mì, mì sợi, hàng hóa làm bằng da, thịt, sản phẩm từ trứng, sữa, đậu tương, nước hoa quả, rau quả, hàng dệt, giấy; từ côn trùng, phân rác, từ phổi của chim, từ ruột của bệnh nhân... Chúng còn có thể được tìm thấy trong đất, đặc biệt vùng đất ẩm, nóng ở các vùng nhiệt đới và á nhiệt đới. Các loài này rất khác nhau về hình thái, màu sắc trên môi trường nuôi cấy và quan sát trên kính hiển vi về cơ quan sinh sản bào tử. Sự khác nhau liên quan tới nguồn gốc thu thập mẫu phân lập chúng. Mẫu phân lập từ đất cho thấy các bông bào tử có màu xanh vàng và có cuống bào tử ngắn. Các chủng phân lập từ gạo và quá trình lên men tương ở vùng phương Đông thấy bông có màu vàng nhạt, giá bào tử dài, vách mỏng.

Tuy nhiên nhóm này cũng có những đặc điểm chung là:

- Màu sắc khuẩn lạc khác nhau từ màu xanh lục tới màu xanh vàng đậm (Ivy green)
- Cuống bào tử thô ráp không màu sắc.
- Đầu hình bán cầu, hình cột hay gần hình cầu.
- Thể bình một lớp hay hai lớp, thường khác nhau ngay trên một bông.
- Bông khác nhau về hình dạng từ bán cầu tới hình vòm trên các đầu nhỏ và hình cầu trên các đầu lớn.
- Bào tử thô khác nhau về màu sắc.
- Hạch nấm có trong nhiều chủng, màu nâu xám tới màu đen.

Hai tên loài là *A. flavus* và *A. oryzae* đã được sử dụng rộng rãi để chỉ nhóm này. *A. oryzae* đã được sử dụng thông thường mà không cần quan tâm

2.1.3. Các loài nấm có khả năng sản sinh Aflatoxin

Như đã biết, có hai loài *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* sản sinh Aflatoxin với các lượng khác nhau tùy thuộc vào chủng nấm, cơ chất, điều kiện khí hậu và môi trường. Một số loài nấm mốc khác cũng có khả năng sinh Aflatoxin với lượng rất ít, ví dụ: loài *Penicillium puberulum* Bai, các chủng thuộc *Aspergillus* như *Aspergillus tamarii* Kita, *Aspergillus niger* Tiegh, *Aspergillus ostia* Mis, *Aspergillus raperi* (Spiek et Brem), *Penicillium citrinum* Thom, *P. variable* Sopp, *P. frequentans* Wesl. Tuy nhiên cũng

còn nhiều tranh cãi vì trong quá trình phát triển, *Aspergillus flavus* thường lẫn với nhiều loài nấm khác, đặc biệt là với *Penicillium rubrum* Stoll và khi đó có thể nhầm Aflatoxin là do *Penicillium* sản sinh ra. Trong một số trường hợp khác cũng có thể nhầm lẫn độc tố Sterigmatocystin và Avenacin có cấu tạo hóa học gần với Aflatoxin.

2.1.4. Điều kiện sản sinh Aflatoxin

Khả năng sinh độc tố của các chủng *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* rất khác nhau. Điều đó phụ thuộc vào các yếu tố như chủng nấm mốc, các cơ chất, các yếu tố nhiệt độ, độ ẩm của cơ chất và môi trường.

a) Các chủng sinh độc tố

Không phải tất cả các chủng *Aspergillus flavus* được khảo sát đều sản sinh ra Aflatoxin, chỉ có 73% có khả năng sinh sản Aflatoxin. Trong đó, 23% sản sinh Aflatoxin ở mức cao nhất (Đậu Ngọc Hào và cộng sự, 1996).

Sự sản sinh Aflatoxin trong tự nhiên cũng rất khác nhau. Aflatoxin B₁ được tìm thấy ở hầu hết các chủng thử nghiệm, Aflatoxin G₁, B₂ cũng được tìm thấy ở nhiều chủng, trong khi đó Aflatoxin G₂ rất ít gặp.

b) Cơ chất và môi trường

Cơ chất là các hạt có dầu, đặc biệt là hạt lạc và các sản phẩm từ lạc. Lượng độc tố chứa trong lạc cao nhất. Các chủng phân lập từ các hạt khác nhau thường không thấy hoặc rất ít khả năng sinh độc tố. Ngay cả trên cùng một cơ chất (ví dụ:

các giống lạc khác nhau), khả năng sản sinh Aflatoxin của các chủng *Aspergillus flavus* cũng khác nhau (bảng 2.3). Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do một số giống lạc có tính kháng với *Aspergillus flavus* sinh Aflatoxin. Các nhà tạo giống đã dựa vào cơ sở phát hiện trên nhằm tạo ra những giống lạc không bị nhiễm Aflatoxin. Đây là hướng nghiên cứu hấp dẫn nhiều nhà khoa học nhằm loại bỏ Aflatoxin khỏi lạc theo cách có lợi nhất.

Sự hình thành Aflatoxin phụ thuộc vào sinh khối sợi nấm và thời gian phát triển. Khối lượng sợi nấm càng nhiều thì sự sản sinh độc tố càng nhiều và ngược lại. Thời gian đạt cực đại để sản sinh Aflatoxin thường từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 7 sau đó giảm đi. Lý do của sự giảm lượng Aflatoxin trong những ngày tiếp theo là do quá trình tự phân giải của chính bản thân nấm mốc.

Nhiệt độ thích hợp nhất để sản sinh Aflatoxin của các chủng nấm mốc là từ 25-28°C. Nếu nuôi cấy *Aspergillus flavus* ở 45°C thì khả năng sản sinh Aflatoxin sẽ bị ức chế.

Hàm lượng nước trong cơ thể đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình hình thành Aflatoxin. Ở lạc nhân có hàm lượng nước từ 15-30%, sự hình thành Aflatoxin xuất hiện sau hai ngày; trên gạo cần lượng nước là 24-26% và ở ngô là từ 19-24%. Như vậy có thể nói, sự sản sinh Aflatoxin diễn ra rất nhanh, đặc biệt sau thu hoạch. Cơ chất có hàm lượng nước khá cao, thời gian làm khô kéo dài là nguyên nhân dẫn đến nhiễm Aflatoxin.

**Bảng 2.1: Khả năng sản sinh Aflatoxin
của một số chủng nấm**

Tên chủng nấm	Trọng lượng sợi khô/1000ml môi trường	Aflatoxin (mg/100ml)		
		B ₁	B ₂	B ₁ +B ₂
Ala - 2	2,6	3,8	3,2	7,0
Ala - 6	4,6	17,1	14,4	31,5
Ala - 8	3,7	15,2	1,4	16,6
NRRL2 ₉₉₉	4,3	27,7	20,8	45,5
ATCC 15517	5,3	28,5	24,0	52,5
ATCC 15548	6,5	34,2	28,8	63,0
ATCC 15547	2,1	0,1	0,1	0,2

**Bảng 2.2: Cơ chất và tỷ lệ giữa Aflatoxin được sản sinh
từ một số chủng *Aspergillus flavus* chuẩn
(Claude Moreau, 1968)**

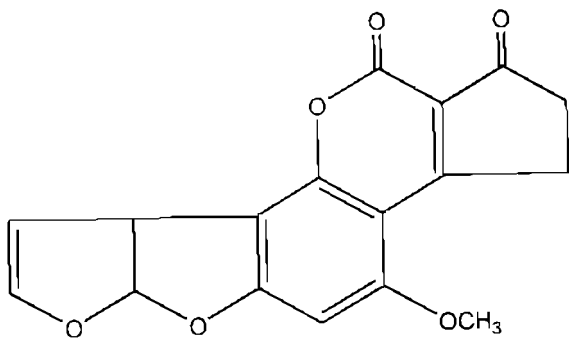
Chủng nấm <i>A. flavus</i>	Môi trường nuôi cấy	Tổng lượng Aflatoxin (mg/kg)	% các Aflatoxin			
			B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
ATTC 15517	Tổng hợp	45	87	4	9	<1
MRE ₁	Lạc	14	98	2	0	0
NRRL 2999	Lúa mỳ	870	35	9	48	7
NRRL 2999	Mỳ + Methionin	1700	44	11	38	7
NRRL 2999	Gạo	—	23,8	6,3	6,8	0,9
NRRL 3000	Saccaroza + a.amin	86	26	0	74	0
NRRL 3000	Saccaroza + a.amin	154	70	0	30	0

2.2. AFLATOXIN

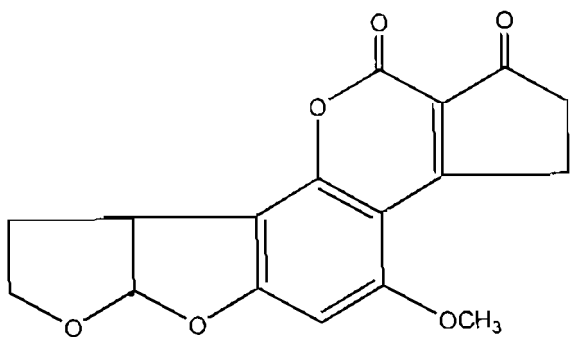
2.2.1 Cấu tạo và các tính chất lý, hóa học của Aflatoxin

Các Aflatoxin B_1 , B_2 và G_1 , G_2 đã được nhiều phòng nghiên cứu xác định cấu trúc hóa học. Thoạt đầu các nhà hóa học đã xác định được có hai Aflatoxin có công thức $C_{17}H_{12}O_6$ và $C_{17}H_{12}O_7$ với trọng lượng phân tử tương ứng 312 và 328. Hiện nay hai độc tố được biết là Aflatoxin B_1 và G_1 . Trong cấu trúc phân tử có các nhóm lacton và metoxyl, không có nhóm hydroxyl tự do. Aflatoxin B_1 có màu huỳnh quang xanh da trời (blue), Aflatoxin G_1 - xanh lá cây (green). Aflatoxin G_1 có chứa 2 vòng lacton, Aflatoxin B_1 - 1 vòng lacton. Sau đó hai Aflatoxin B_2 và G_2 cũng được phát hiện. Chúng có công thức hóa học hoàn toàn giống với Aflatoxin B_1 và G_1 , chỉ khác là nối đôi trong vòng hydrofuran đã bị khử (bảng 2.4).

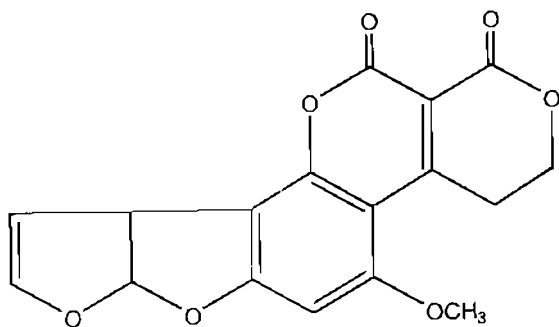
Năm 1966 Dutton và Heathcote đã phát hiện thấy trong môi trường nuôi cấy hai dẫn chất hydroxi-2 của Aflatoxin B_2 và Aflatoxin G_2 là Aflatoxin B_{2a} và Aflatoxin G_{2a} . Allcroft và Carnaghan đã nhận thấy trong sữa và thịt bò cũng có các dẫn chất của Aflatoxin B_1 và B_2 , được đặt tên là Aflatoxin M_1 và M_2 (Milk). Cả hai chất này đều bắt màu huỳnh quang màu xanh tím. Ở gan, thận và nước tiểu của cừu cũng tìm được hợp chất như vậy. Theo Dalezios và Wogan, trong nước tiểu của khỉ có Aflatoxin P_1 , dẫn chất của Aflatoxin B_1 . Một Aflatoxin khác cũng được phát hiện gọi là Aflatoxin 3B hay Parasiticol.



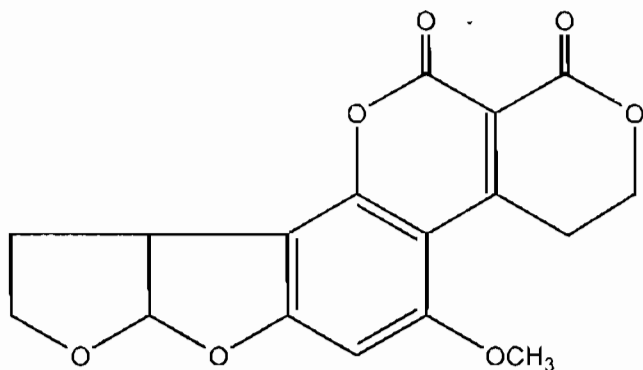
Aflatoxin B₁



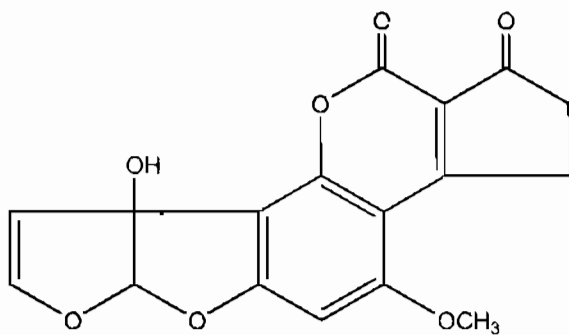
Aflatoxin B₂



Aflatoxin G₁



Aflatoxin G₂



Aflatoxin M₁

Hình 2.2: Cấu trúc hóa học của Aflatoxin (Jones, 1977)

**Bảng 2.3: Tính chất lý hóa của các Aflatoxin
(Townsend, Stubblefield và Beljiaans)**

Aflatoxin	Công thức	Trọng lượng phân tử	Điểm nóng chảy	Huỳnh quang	Hấp thụ tia UV trong EtOH	Độ quay cực quang học CHCl_3 [α] _D
Aflatoxin B ₁	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$	312	268-269	Xanh lam	223,265 và 362	-558°
Aflatoxin B ₂	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	314	286-289	Xanh lam	222,265 và 362	-492°
Aflatoxin G ₁	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$	328	244-246	Xanh lục	243,264 và 362	-556°
Aflatoxin G ₂	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	330	229-231	Xanh lục	221,265 và 357	-473°
Aflatoxin M ₁	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$	328	299	Xanh tím	226,265 và 357	-280°
Aflatoxin M ₂	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	330	293	Xanh tím	221,264 và 357	-

2.2.2. Phương pháp phân tích Aflatoxin

Có hai phương pháp được sử dụng để phân tích Aflatoxin: phương pháp vật lý hóa học và phương pháp hóa sinh học.

2.2.2.1. Phương pháp vật lý hóa học

Phương pháp này dựa trên nguyên lý các Aflatoxin dễ dàng tách ra khỏi mẫu phân tích bằng các dung môi hữu cơ

phân cực mạnh như cloroform, methanol, ethanol, axeton, benzen. Các Aflatoxin cũng có tính không hòa tan trong các dung môi hexan, ete petrol, ete etylic.

Từ năm 1961, Sargeant và cộng sự đã chiết xuất Aflatoxin trong khô lạc bằng methanol. Đây là phương pháp đơn giản đầu tiên, Aflatoxin được hoà tan trong methanol và được loại mỡ bằng ete petrol. Dùng phương pháp sắc ký lớp mỏng để tách Aflatoxin và được phát hiện dưới ánh sáng tử ngoại UV 360nm.

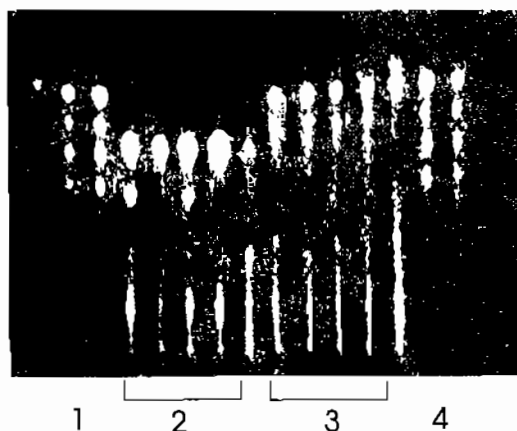
Chiết xuất Aflatoxin bằng cloroform có thể tách hoàn toàn Aflatoxin ra khỏi cơ chất, được làm sạch mỡ qua cột hexan và ete etylic, thu hồi lại bằng cloroform, bốc hơi cloroform và sử dụng cho phân tích tiếp theo.

a) Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography - TLC)

Phương pháp sắc ký lớp mỏng được sử dụng rộng rãi để xác định định lượng Aflatoxin lần đầu tiên vào những năm 1960 (Coomes et al, 1964, 1965). Thủ tục phân tích sử dụng các bản được tráng bởi Silica gel. Dung môi sử dụng cho dung dịch chạy bản mỏng là chloroform: methanol và chloroform: axeton (Pons et al, 1966). Việc thêm nước vào hệ thống dung môi sẽ làm tăng khả năng hòa tan Aflatoxin.

Hệ dung môi gồm: nước : axeton : chloroform (1,5:12:88 v/v) được đánh giá có khả năng hòa tan Aflatoxin tốt nhất (Stubbllefield, 1969). Các bản mỏng đã được chảy qua các

dung môi chạy được đưa vào chiếu bởi đèn tử ngoại (UV) 365nm. Các vết mẫu phân tích có màu huỳnh quang xanh da trời hay xanh lá cây và có độ dài R_f được so sánh với các vết của Aflatoxin tiêu chuẩn. Phương pháp này có thể xác định được lượng từ $3-4 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}$ (0,3-0,4 ng) (Coonmes, 1965) (hình 2.3).



Hình 2.3: Bản sắc ký lớp mỏng (TLC) bao gồm các Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 và G_2 (mẫu chuẩn 1 và 4); mẫu đậu tương (2) mẫu ngô (3)

Mẫu ngô chỉ ra các vết Aflatoxin B_1 và B_2 có độ dài R tương đương với độ dài R_f của các vết Toxin chuẩn B_1 và B_2

Nhược điểm của phương pháp này là phụ thuộc vào người phân tích. Khi so sánh giữa mẫu và các vết của độc tố chuẩn có thể có sự sai lệch kết quả tới 20-30%.

* Phương pháp đo mật độ huỳnh quang trên máy fluorodensitometer

Fluorodensitometer có nhiều tiến bộ hơn, chính xác hơn so với nhìn bằng mắt thường (Dons, 1968). Tuy nhiên ở nhiều phòng thí nghiệm hiện đại vẫn sử dụng phương pháp nhìn để so sánh trực tiếp các vết trên bản mỏng vì dễ hơn nhiều khi phải qua máy densitometer.

Hội hoá học phân tích (A.O.A.C - 1980) đã lưu ý tới phương pháp phân tích định lượng sử dụng TLC. Phương pháp này được mở rộng thành chương trình phân tích mẫu của tổ chức nghiên cứu ung thư thế giới (International Agency for Research on Cancer) (Friesen, 1980, 1982). Các kết quả của chương trình phân tích mẫu trên đã chứng nhận sự thiếu chính xác của phân tích bằng TLC vì sai số rất cao (từ 30-122%).

Hiện có 4 phương pháp phân tích bằng TLC, phổ biến nhất là CB (Contamination Branch), BF (The Best Foods), EEC (The European Economic Community) và Pon's (Pons Methods). Phương pháp CB tỏ ra ưu điểm hơn cả và thường xuyên được sử dụng. Tuy nhiên phương pháp CB đắt, sử dụng quá nhiều dung môi phân tích. Phương pháp BF có tính thực tế hơn nhiều, dễ làm và tiêu thụ ít dung môi; dung môi sử dụng là nước và methanol ít độc hơn chloroform. Phương pháp của Pons có nhiều ưu điểm, sử dụng hệ dung môi là axeton và nước, dung môi này không hòa tan mỡ.

Cả 4 phương pháp trên đều sử dụng hệ dung môi chạy là chloroform và axeton.

Khẳng định sự có mặt của Aflatoxin:

Một số chất được tách ra từ mẫu đôi khi dễ nhầm lẫn với Aflatoxin, dẫn đến sự khẳng định sai lệch. Phương pháp khẳng định sự có mặt của Aflatoxin trực tiếp thực hiện trên các bản sắc ký. Dựa vào sự biến đổi của Aflatoxin thành các đồng phân có màu huỳnh quang khác so với huỳnh quang ban đầu, cả Aflatoxin chuẩn và Aflatoxin có trong mẫu phân tích đều chuyển sang có cùng một đồng phân. Thử nghiệm khẳng định sự có mặt của Aflatoxin trong mẫu phân tích được phát hiện bởi Przybylski (1975) và Verhulsdonk (1977) và được hội phân tích hóa học Hoa Kỳ (A.O.A.C) công nhận. Aflatoxin B₁ được axit hóa để trở thành đồng phân Aflatoxin B_{2a}. Đồng phân này có màu huỳnh quang màu xanh và có độ dài R_f thấp hơn so với độ dài R_f của Aflatoxin B₁. Theo phương pháp của Przybylski, Aflatoxin B₁ được chuyển thành Aflatoxin B_{2a} nhờ axit trifloaxetic (TFA) phun trực tiếp trên các bản mỏng. Axit sulfuric 50% cũng được sử dụng để phun trực tiếp lên các bản mỏng trước khi chạy trong dung môi chạy. Axit sulfuric làm thay đổi màu huỳnh quang xanh da trời của Aflatoxin B₁ thành màu vàng. Thử nghiệm này nhằm khẳng định sự không có mặt của Aflatoxin nếu vết nghi ngờ không chuyển thành màu vàng.

b) Sắc ký lớp mỏng hiệu suất cao (High performance thin layer chromatography - HPTLC)

Do những khiếm khuyết trong phương pháp sắc ký lớp mỏng đơn thuần ở các khâu như chiết tách mẫu phân tích, chạy mẫu trong dung môi, phương pháp HPTLC có tính thuyết phục cao hơn ở 3 khía cạnh sau: Đưa mẫu lên bản mỏng một cách tự động (1); cải thiện được sự đồng nhất cả lớp hấp thụ (2); chạy bản mỏng trong dung môi có kiểm soát (3).

Quá trình đưa mẫu vào bản mỏng được tự động hóa, do đó, các vết được định đúng vị trí và đo cường độ huỳnh quang của vết cũng bằng máy densitometers. Thể tích mẫu được dùng trong HPTLC có thể = 1 μ l so với 5-10 μ l mẫu trong phương pháp TLC, như vậy sẽ làm giảm đi rất nhiều diện tích của vết (=1mm). Nồng độ chất chuẩn có thể chỉ cần 5pg trong phân tích bằng HPTLC, do đó có thể xác định tới 30pg (0,03 μ g) Aflatoxin B₁ ở lạc (Coker,19).

Sử dụng kỹ thuật HPTLC làm tăng tính thuyết phục của phương pháp TLC như một phương pháp định lượng Aflatoxin có hiệu quả nhất.

c) Phương pháp sắc ký lỏng cao áp (High performance liquid chromatography - HPLC)

Hệ thống phân tích Aflatoxin tự động HPLC là hệ thống phân tích đất tiên, chọn lọc, dùng xác định định lượng Aflatoxin. Phương pháp HPLC sử dụng cả hai pha: pha bình thường và pha phản. Hệ thống này dựa trên sự hấp thụ tia tím

(UV) và xác định cường độ huỳnh quang. Trong pha bình thường, pha tĩnh là rắn, phân cực hơn pha động. Trong pha phản, pha bình thường là pha phản pha, pha tĩnh là lỏng và ít phân cực hơn pha động. Trong HPLC, pha phản được sử dụng để tách Aflatoxin nhiều hơn pha bình thường.

Mẫu phân tích được tách bằng chloroform: nước. Ly tâm chất tách và làm sạch qua Silica gel. Pha bình thường sử dụng cột nhồi Silica gel 5 μ m và pha động sử dụng benzen: axetonitril: axit formic. Giới hạn xác định là 0,5 μ g/kg. Hurst (1984) đã sử dụng pha phản kết hợp với TFA đồng phân để xác định được các Aflatoxin trong lạc. Sử dụng pha phản với sự hình thành các đồng phân có thể xác định được các Aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂ ở nồng độ 5pg.

Davis (1980) cũng sử dụng pha phản để xác định huỳnh quang của đồng phân Iod của Aflatoxin B₁. Kết quả dẫn đến việc phát triển phương pháp đồng phân cột (Stephand, 1984).

d) Phương pháp cột mini (Minicolumn methods)

Phương pháp cột mini nhằm xác định nhanh Aflatoxin có trong mẫu. Phương pháp này đơn giản, ít tốn kém, nhưng chỉ xác định định tính.

Kỹ thuật cột mini là cột sắc ký bằng thủy tinh hay chất dẻo có kích thước khoảng 3-6mm chiều rộng và 20cm chiều dài. Dung dịch chiết tách được làm sạch bằng dung môi/dung môi và hòa tan trong một lượng nhỏ benzen hay chloroform. Cột được nhồi Silica gel như một chất hấp thụ và quan sát

dưới ánh sáng tử ngoại (UV) để xác định màu huỳnh quang xanh chỉ ra sự có mặt của Aflatoxin.

Nhiều tác giả như Davis và cộng sự (1981), Holaday (1976), Holaday và Lansden (1975) đã cải tiến phương pháp này nhằm phát hiện nhanh Aflatoxin trong mẫu. Phương pháp cột mini của Romes (1975) đã được A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists) (1980) công nhận. Aflatoxin được tách bằng axeton và nước (85:15), các chất tạp được loại trên gel cacbonat đồng và chloric sắt. Sau đó, Aflatoxin được tách ra bằng một pha nước với chloroform. Chloroform tách được đưa vào cột có chứa một lớp bột nhôm trung tính, silica gel và florisil ở phía dưới, sunfat canxi khô ở cả trên và dưới. Cột được chạy trong chloroform và axeton (9:1) để giữ Aflatoxin trên đỉnh của lớp florisil. Ở đó Aflatoxin có thể được xác định bởi màu huỳnh quang xanh dưới đèn tử ngoại.

Hiện nay các cột mini được sản xuất và bán thị trường (Myco-Lab-Co, POBox 321, St. Louis, MO 63017, USA).

2.2.2.2. Phương pháp hóa sinh học (*Immunochemical methods*)

Phương pháp hóa sinh miễn dịch mang tính đặc hiệu cao, dựa trên nguyên lý kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu. Hai phương pháp hiện dùng là: Aflatoxin đánh dấu phóng xạ (radio-labeled Aflatoxin) và Aflatoxin gắn men (Pestka, 1980, 1981). Do sự tiến bộ của kỹ thuật miễn dịch trong những năm qua, đã phát triển nhiều hệ thống ELISA

khác nhau để xác định Aflatoxin và kháng thể đơn và đa dòng (monoclonal và polyclonal). Phương pháp sử dụng kháng thể đơn dòng (monoclonal) tỏ ra đặc hiệu với Aflatoxin B₁ và Aflatoxin B₂ (100-125%), với Aflatoxin G₁ tới 30%. Trong khi đó kháng thể đơn dòng (monoclonal) tỏ ra đặc hiệu với Aflatoxin B₁ và không phản ứng chéo với Aflatoxin G₁ (Kawamura, 1988). Tuy nhiên Hetle và Chu (1990) cho rằng kháng thể đơn dòng có phản ứng chéo với Aflatoxin B₂, G₁, G₂.

Theo ý kiến của một số tác giả ở nhiều nước, việc xác định 4 loại Aflatoxin B₁, B₂ và G₁, G₂ có mặt trong tự nhiên mang tính thực tiễn hơn là chỉ xác định Aflatoxin B₁. Do vậy dùng kháng thể đa dòng hay đơn dòng để xác định Aflatoxin không trở nên nhất thiết.

** Phương pháp ELISA (enzyme - linked immunoabsorbant assay)*

Phương pháp ELISA gồm ELISA trực tiếp (direct) và ELISA gián tiếp (indirect).

ELISA trực tiếp sử dụng Aflatoxin gắn men (Aflatoxin - enzyme conjugate), ELISA gián tiếp - Aflatoxin gắn protein (Aflatoxin - protein conjugate) và một kháng thể thứ hai (Secondary antibody) như IgG kháng thể (anti rabbit IgG). Cả hai phương pháp trực tiếp hay gián tiếp đều sử dụng men peroxidaza (HRP) và men photphataza kiềm để gắn (Chu, 1984).

a) ELISA trực tiếp (direct competitive ELISA)

Phương pháp ELISA trực tiếp dựa trên nguyên lý kháng thể đặc hiệu được phủ trên các đĩa chuẩn độ (microtiter). Dung dịch tách từ mẫu hay Aflatoxin chuẩn được ủ cùng nhau hay tách thành 2 bước. Sau đó rửa bằng dung dịch thích hợp. Lượng men gắn vào đĩa được xác định bằng dung dịch đặc biệt. Phản ứng màu được đo bằng quang phổ hoặc so sánh bằng mắt thường với các đĩa tiêu chuẩn.

Phương pháp ELISA này nhiều khi cũng chiếm thời gian và sai số lớn trong cùng một mẫu phân tích do sự xâm nhập của các chất ngoại lai có trong mẫu tách. Chu và cộng sự (1978) đã phát triển một phương pháp đơn giản hơn, chỉ cần một giờ là có thể phát hiện được Aflatoxin B₁ trong lạc và ngô, dựa trên nguyên lý chiết mẫu bằng methanol và nước có chứa dimethyl formamid. Bằng phương pháp này có thể phát hiện tới 95,4% Aflatoxin B₁ trong bơ. Tính miễn cảm của phương pháp ELISA cũng có thể qua các bước làm sạch mẫu. Ram (1986) đề nghị cần làm sạch mẫu trước khi đưa vào phản ứng ELISA.

b) ELISA gián tiếp (indirect ELISA)

Trong phương pháp này Aflatoxin gắn vào protein được phủ các đĩa chuẩn độ (microtiter). Mẫu tách hay Aflatoxin chuẩn được đưa vào đĩa, tiếp theo là kháng thể thứ cấp (anti Aflatoxin antibody). Lượng kháng thể gắn vào đĩa được xác

định do thêm IgG kháng thể (anti rabbit IgG) gắn với photphatasa kiềm (ALP) và phản ứng màu xảy ra với P - nitrophenyl photphat. Lượng độc tố được xác định bằng cách so sánh với đường độc tố chuẩn (Standard Curve). Toàn bộ quá trình chiếm khoảng 5 giờ. Kawamura (1988) đã cải tiến phương pháp và xác định Aflatoxin trong thời gian 3,5 giờ, độ nhạy phản ứng là 1 ppb. So sánh với phương pháp ELISA trực tiếp, phương pháp ELISA gián tiếp trải qua nhiều bước hơn và cần một kháng thể thứ cấp, vì vậy khả năng sai số cao và chiếm nhiều thời gian.

c) Phương pháp kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) trong phân tích ELISA

Do sự không đặc hiệu của phân tích ELISA trong quá trình sản xuất kháng thể đa dòng (polyclonal antibody) trên thỏ, người ta đã sản xuất kháng thể đơn dòng nhằm mục đích loại bỏ sự thiếu chính xác do phản ứng chéo (crossreaction) giữa các Aflatoxin với nhau, đặc biệt là Aflatoxin B₁ và G₁.

Nguyên lý của sản xuất kháng thể đơn dòng:

Đây là phương pháp phức tạp. Kháng thể đơn dòng (McAb) được sản xuất sau khi pha trộn tế bào myeloma của chuột nhắt trắng với tế bào lách phân lập từ tế bào lai F1, được miễn dịch bằng Aflatoxin B₁ (oxime - conjugate). Dòng tế bào lai hybridoma sản sinh kháng thể đặc hiệu chống Aflatoxin B₁ mọc trên môi trường nuôi cấy tế bào. Dịch nuôi cấy thu được có hàm lượng chuẩn độ cao (1:800.000) bằng

phương pháp phân tích enzym miễn dịch và được gắn men peroxidaza conjugate theo 2 bước với glutaraldehyd. Conjugate được sử dụng cho phân tích ELISA trực tiếp với Aflatoxin B₁. Độ nhạy cảm của phương pháp đạt 0,2 ng/ml với mức xác định là ng/ml. Tính đặc hiệu của phương pháp đã được ghi nhận là không có phản ứng ngưng kết chéo với bất kỳ đồng phân nào. Phương pháp này cũng được ứng dụng để xác định Aflatoxin B₁ trong thức ăn chăn nuôi và thực phẩm.

Bảng 2.5: Phản ứng ngưng kết chéo giữa các Aflatoxin và đồng phân trong monoclonal antibody ELISA
(Cauddish, 1985)

Đồng phân Aflatoxin	Tỷ lệ % phản ứng chéo
Aflatoxin B ₁	100
Aflatoxin G ₁	14,3
Aflatoxin B ₂	12,5
Aflatoxin M ₁	7,3
Aflatoxin M ₂	4,4
Aflatoxin G ₂	1,8
Aflatoxin G _{2a}	0,08
Aflatoxin G _{2b}	0,03

d) Kit ELISA thương phẩm

Một số các hãng của Anh, Pháp, Nhật Bản và Mỹ đã sản xuất ra các kit ELISA nhằm phân tích Aflatoxin. Trừ "Biokit" là ELISA gián tiếp, còn lại các kit khác đều là trực tiếp (bảng 2.6).

Các kit ELISA được sử dụng đơn giản, nhanh chóng và thích hợp ở lượng Aflatoxin 20 ppb.

Một vài dịch chiết được nhỏ lên giấy trên bàn plastic. Nhỏ tiếp Aflatoxin đã gắn men, sau đó cho dung dịch chất hiện màu. Sự không xuất hiện màu cho thấy sự có mặt của Aflatoxin trong các mẫu chiết tách. Màu xanh sáng là không có 1 Aflatoxin. Phương pháp chỉ mang tính chất định tính, không có ý nghĩa định lượng. Hạn chế của phương pháp này là giá bản kit còn cao, chỉ phù hợp cho kiểm tra sản phẩm xuất nhập khẩu và các chương trình giám sát Aflatoxin. Cần được hoàn chỉnh và giảm giá do tự chế tạo để phục vụ cho sản xuất.

Bảng 2.6: Các kit ELISA thương phẩm để phân tích Aflatoxin

Đặc tính	Quntitor	Aflasure (UK)	Biokit (UK)	Trasnia (France)	Afla - Check (Japan)
Đặc hiệu	B ₁	B ₁ , B ₂	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	B ₁
Bước sóng hấp phụ	450nm	450nm	414nm	410nm	492nm
Giới hạn định lượng (ppb)	2-30	2-200	2-200	1-30	2-40
Dung dịch chiết	Methanol nước (55:45)	Axetonitril nước (60:40)	Axetonitril nước (50:50)	Methanol nước (80:20)	Methanol nước (55:45)

2.2.3. Phương pháp phân tích nhanh hàm lượng Aflatoxin trong ngô (Phương pháp BGYP)

Theo một thủ tục phân tích trong phòng thí nghiệm đòi hỏi phải có thời gian và rất tốn kém tài chính. Vì vậy người ta đã tìm ra những phương pháp đơn giản hơn nhằm đáp ứng được đòi hỏi trong quá trình mua bán trên thị trường.

Phương pháp sử dụng cột mini (mini column) được các nhà hóa học phát triển nhằm xác định nhanh hàm lượng Aflatoxin có trong mẫu, tuy nhiên độ chính xác kém vì dung lượng mẫu sử dụng trong quá trình này quá ít.

Hiện nay người ta sử dụng kỹ thuật BGYP (bright green yellow fluorescences), kỹ thuật này dựa trên sự phát sáng của đèn huỳnh quang màu vàng xanh của các hạt bị nhiễm Aflatoxin dưới ánh sáng đèn tử ngoại 365nm. Kỹ thuật này được gọi là phương pháp sàng lọc (screening) nhằm phát hiện nhanh lô hàng có hàm lượng Aflatoxin thấp. Nếu như trong một phạm vi mẫu khoảng 4,54kg mà không thấy có hạt màu vàng xanh, lô hàng được coi như có hàm lượng Aflatoxin thấp. Nếu như có những hạt có màu huỳnh quang vàng xanh thì cần được đánh giá theo những thang mẫu qui định.

Ở Mỹ người ta chấp nhận phương pháp BGYP để đánh giá tình trạng nhiễm Aflatoxin trong lô hàng hóa có hàm lượng từ 20-100 ppb. Phương pháp này cũng được áp dụng ở nhiều nước và quy định mức nhiễm Aflatoxin từ 20 ppb trở lên tùy theo mục đích sử dụng.

Phương pháp BGYF cũng được áp dụng với ngô trắng và ngô đã qua bảo quản nhưng phương pháp này gặp khó khăn trong ước lượng mang tính định lượng.

Dickens và Whitker đã bỏ thời gian nghiên cứu xác định mối tương quan giữa phần trăm trọng lượng của ngô hạt biểu hiện BGYF và hàm lượng Aflatoxin có trong lô ngô vàng bán trên thị trường. Họ nhận thấy nếu các hạt ngô có BGYF và hàm lượng Aflatoxin có trong lô ngô vàng được nhặt ra từ 1134kg mẫu có hàm lượng Aflatoxin trung bình là 8665ppb, thì số còn lại chỉ đạt 46ppb.

Họ đã thực hiện và thiết lập được phương trình hồi qui tuyến tính biểu diễn mối tương quan này dùng một khối lượng mẫu tới 23044,5kg là: ppb trong mẫu = 197% trọng lượng hạt có BGYF với hệ số tương quan tới 0,9ppb.

Họ cũng đã nghiên cứu so sánh giữa phương pháp BGYF và phương pháp của A.O.A.C. Theo phương pháp của A.O.A.C thì nếu hàm lượng trung bình của các lô hàng đã được chấp nhận là 4,10 hay 10 ppb Aflatoxin, thì lượng chấp nhận sẽ là 20,50 hay 100ppb. Nếu theo phương pháp của BGYF thì lượng được chấp nhận của lô là 10,60 hay 22 ppb, khi lượng chấp nhận <0,1%, <0,25% hoặc <0,5% BGYF.

Kết quả cũng đã cho thấy phương pháp phân tích hóa học của A.O.A.C có độ chính xác cao hơn hẳn so với phương pháp của BGYF. Tuy nhiên sự khác nhau là % của lượng Aflatoxin trung bình trong lô hàng đã được chấp nhận tăng

lên. Cả hai phương pháp phân tích và đánh giá phải được cân nhắc khi lựa chọn giữa các phương pháp.

2.2.4. Các bước dẫn tới sai sót trong quá trình phân tích xác định định lượng Aflatoxin

Do sự phân bố hàm lượng Aflatoxin không đồng đều trong lô phân tích, đặc biệt đối với lô hàng ở dạng hạt như ngô, hạt bông, lạc... Các loại hạt này có thể bị mốc hoặc bị sâu mọt nên có chứa hàm lượng Aflatoxin cao hơn so với các hạt khác. Số lượng hạt bị mốc hay sâu mọt có khi tập trung vào những khu vực nhất định như trên bề mặt, trong các khu vực bị rò rỉ... Vì vậy sẽ gây ra những chênh lệch về hàm lượng đôi khi rất lớn trong cùng một lô hàng phân tích. Bên cạnh đó khi lấy mẫu người ta vẫn có thể bị áp đặt tính chủ quan và vì vậy cũng là nguyên nhân dẫn đến sự sai lệch kết quả phân tích. Đã có những công trình nghiên cứu cho thấy sự biến động hàm lượng Aflatoxin có thể từ 0-500 ppb do sự có mặt hay không có mặt của hạt bị mốc. Như vậy nếu muốn tăng cao tính chân thực của kết quả phân tích với hàm lượng có thực trong lô hàng thì quá trình lấy mẫu cần phải được thiết kế và nghiên cứu. Sự sai sót có thể bắt đầu từ khi lấy mẫu từ lô hàng cho tới khi từ mẫu đó một lượng nhỏ hơn lại tiếp tục được đem nghiền ra và lại một lần nữa một khối lượng nhỏ vừa đủ cho phân tích lại được lấy tiếp theo. Cuối cùng sai sót còn tồn tại trong quá trình xử lý, chiết tách mẫu và đánh giá đo lường mẫu trong các phương pháp.

Để khắc phục tình trạng trên, người ta đã thiết lập những chương trình phân tích mẫu để nghiên cứu nhằm giảm tối thiểu quá trình dẫn đến sai sót. Theo phương pháp phân tích và đánh giá của Hội phân tích hóa học Hoa kỳ (A.O.A.C) thì không thiết kế dung lượng mẫu bắt buộc, song bắt buộc mẫu phải được nghiền nhỏ tới những qui định. Lần đầu tiên mẫu phải được nghiền để qua được rây số 20. Sau cùng 50g mẫu được sử dụng cho chiết tách và dùng cho phân tích.

Theo tác giả Whitker và cộng sự thì quá trình dẫn đến sai sót trong phân tích có thể được thiết lập và biểu diễn như sau:

$$1. V = S + C + F + Q$$

$$2. S = 3,9539 P/W_s$$

$$3. C = 0,1196 P/W_c$$

$$4. F' = 0,0125 P/W_f$$

$$5. Q = 0,0699 p^3/N_q$$

Trong đó: V: là biểu diễn tổng các sai sót có thể

S: là sai sót trong quá trình lấy mẫu từ lô hàng

C: là sai sót từ quá trình lấy mẫu từ mẫu ban đầu

F: là lần lấy mẫu cuối cùng từ C

Q: là sai sót trong các bước xử lý mẫu

Ws: khối lượng mẫu lấy lần đầu từ lô hàng (kg)

Wc: khối lượng mẫu lấy ra để nghiền từ Ws (kg)

Wf: khối lượng mẫu cuối cùng lấy từ Wc dùng để phân tích (kg)

Nq: số lần Aflatoxin phải qua các công đoạn chiết tách để sử dụng cho phân tích cuối cùng.

P: là hàm lượng Aflatoxin trong lô hàng phân tích bằng ppb hay $\mu\text{g/kg}$.

Kết quả của các công thức 2, 3, 4 là dựa trên những phân tích chi tiết trong phòng thí nghiệm với dung lượng mẫu cho cả 3 lần đã được tính toán và ước lượng cả nhưng sai sót trong khi lấy mẫu để khắc phục tính chủ quan. Chỉ có thể có sự đồng nhất hàm lượng Aflatoxin có trong hạt mới hy vọng khắc phục được sai sót do 2, 3 và 4. Nhưng điều đó không xảy ra trong thực tế.

Công thức 5 phản ánh sự sai sót trong các bước phân tích. Thông thường qua các bước làm sạch mẫu, sử dụng các dung môi phân tích để chiết tách có thể dẫn tới làm sai sót hàm lượng Aflatoxin trong mẫu. Sự đánh giá bằng mắt thường trên bản mỏng theo phương pháp phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC) cũng thường dẫn đến sự sai sót do tính chủ quan. Ngay cả nếu sử dụng máy đo mật độ quang học Spectrophotometer cũng vẫn tồn tại những sai sót khi đánh giá kết quả trên bản mỏng. Chỉ có sử dụng các phương pháp hiện đại hơn như sắc ký lỏng cao áp (HPLC) thì mới hy vọng làm giảm sai sót trong bước đánh giá cuối cùng.

Như thế chỉ có thể giảm thiểu sự sai sót trong phân tích định lượng Aflatoxin khi các yếu tố có thể gây sai sót trong toàn bộ quá trình lấy mẫu và phân tích mẫu được chú ý và được tính toán tối ưu. Mối quan hệ giữa dung lượng mẫu, số lượng hạt đại diện được dùng trong phân tích và độ mịn của

mẫu cuối cùng được đưa vào chiết tách là rất quan trọng. Điều này sẽ quyết định mức độ tương quan giữa kết quả phân tích với hàm lượng có trong lô phân tích.

Tuy nhiên nếu yêu cầu về mối tương quan càng cao thì chi phí cho quá trình phân tích càng lớn. Nói chung dung lượng mẫu càng cao, tỷ lệ hạt càng lớn trong quá trình phân tích, đảm bảo mức chính xác và mối tương quan càng lớn, song chi phí quá cao sẽ cản trở công việc trên. Vì vậy các bước lấy mẫu phân tích cần được tính toán để đảm bảo sự phù hợp với khối lượng của lô hàng hóa phân tích.

2.2.5. Phương pháp phân tích Aflatoxin trong tế bào động vật (Dựa theo A.O.A.C, 1982)

Phương pháp này có thể xác định được Aflatoxin B₁ và Aflatoxin M₁ trong thịt bò, lợn, gà và trong gan người, thận, tim, lách, thịt, trong máu vật nuôi. Giới hạn xác định là khoảng 0,1ppb cho tất cả các đối tượng phân tích.

a) Hóa chất dùng trong phân tích

Axit Glacial axetic, Benzen, Hexan, Isopropanol, Axeton, Axetonitril, Dichloromethan, Toluen, Trifluoraxetic axit (TFA) trong Hexan (1:4)

Axit Citric dung dịch 20%.

Silicagel cho sắc ký bản mỏng (TLC).

Silicagel cho sắc ký cột.

Natri sunphat khan (Na₂SO₄ khan)

Diatomaceous earth hay là Hyflosuper-cel

Aflatoxin tiêu chuẩn

Aflatoxin B₁ mẫu: 0,25µg/ml trong Axetonitril : Benzen
1:9 v.v...

Aflatoxin M₁ mẫu: 0,25µg/ml trong Axetonitril : Benzen
1:9 v.v...

b) Dụng cụ

Dụng cụ phòng thí nghiệm: Máy nghiền thịt, máy sấy, máy lắc, cột sắc ký

Cột sắc ký có kích thước 50×1,0cm có nút đậy bằng polyethylen.

Giấy lọc: 32cm số 588; 25cm số 560 hay tương đương.

Bộ bình sắc ký, máy bốc hơi loại Rotary evaporator.

c) Các bước tiến hành phân tích.

**** Chiết tách mẫu:***

- Nghiền mẫu cho đến khi thành khối đồng nhất, cân 100g mẫu hay 100ml máu vào bình Erlanmayer miệng rộng có nắp đậy.

- Thêm 10ml dung dịch axit citric 20%, khuấy đều bằng đũa thủy tinh, sau lại khuấy tiếp trong 5 phút.

- Thêm 20g Hyflosuper-cel (40g cho mẫu máu)

- Thêm 200ml Dichloromethan, khuấy đều.

- Lọc qua giấy lọc nhanh số 588 vào bình Erlanmayer có chứa 20g Na₂SO₄ khan.

- Chiết lại lần hai qua giấy lọc 560.

- Chuyển dung dịch đã lọc được qua bình Erlanmayer có nút. Bốc hơi đến khô bằng Rotary evaporator và cặn sử dụng cho làm sạch bằng sắc ký cột.

* *Sắc ký cột:*

Chuẩn bị cột:

- Đặt một lớp bông xuống đáy cột sắc ký và đưa vào cột 2g Na_2SO_4 khan.

- Đổ vào cột dung môi Dichloromethan và điều chỉnh lượng Chloromethan xuống 3mm trên lớp Silicagel.

- Thêm 2g Na_2SO_4 khan lên lớp bề mặt cột, rửa cột bằng Dichloromethan và điều chỉnh tới 1mm phía trên lớp Na_2SO_4

Làm sạch mẫu:

- Cặn được hòa tan trong 25 ml Dichloromethan và chuyển vào cột.

- Vặn van để chảy tự do cho đến đỉnh của lớp Na_2SO_4 .

- Rửa cột bằng 25 ml glacial axetic axit: toluen (1:9), sau đó bằng 25 ml hexan và 25 ml dung dịch axetonitril: diethyl ete - hexan (1:3:6). Loại bỏ dung dịch rửa.

- Thu hồi Aflatoxin trong cột bằng 60 ml dung dịch acetone: dichloromethan (1:4) vào bình Erlanmayer.

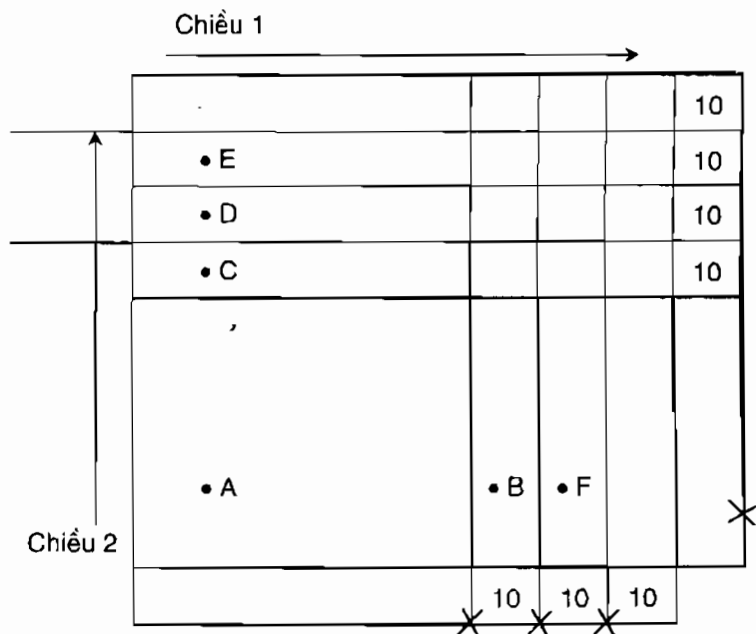
- Bốc hơi dung môi thu hồi bằng máy Rotary-evaporator và sử dụng cho sắc ký.

d) Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC)

- Thêm 100 μl axetonitril: benzen (1:9) vào cặn thu được qua sắc ký cột.

- Sử dụng bản mỏng 20×20 cm, một vị trí A được chấm 20 µl mẫu, 6,2,4 và 6µl dung dịch chuẩn Aflatoxin B₁ hay M₁ dùng cho mắt thường và 10,5,5 và 10 µl dùng cho máy đo mật độ quang học (densitometric) vào các vị trí B, C, D và E (hình 2.4).

- Chạy bản mỏng chiều thứ nhất trong dung môi propanol: axeton: chloroform (3:10:87) đến điểm đã qui định (dưới B).



Hình 2.4: Sơ đồ chạy chiều 1 và chiều 2

Bản mỏng 10×10

Chiều 1: 15, 55, 10, 10, 10

Chiều 2: 15, 45, 10, 10, 10, 10

- Đưa bản mỏng khỏi buồng chạy và làm khô từ 2-5 phút.

- Chạy bản mỏng chiều 2 trong hệ dung môi nước: methanol: diethyl ete (1:4:95).

- Lấy bản mỏng khỏi buồng chạy làm khô từ 2-5 phút.

- Xem màu huỳnh quang của Aflatoxin dưới đèn tử ngoại bước sóng dài 365 nm. Hoặc đo mật độ quang học.

d) Phương pháp tính kết quả

Dựa vào các vết có màu huỳnh quang xanh da trời dưới đèn UV 365nm với độ dài R_f tương đương qua vết màu phân tích và vết màu Aflatoxin chuẩn. Kết quả sẽ được tính như sau:

$$W(\mu\text{g/kg hay ppb}) = \frac{P_s V_s V_1 V_3}{m V_2 V_4}$$

Trong đó:

P_s : Nồng độ Aflatoxin chuẩn (0,25 $\mu\text{g/ml}$)

V_s : Thể tích Aflatoxin chuẩn tương đương với thể tích mẫu phân tích (μl)

V_1 : Thể tích pha loãng mẫu (μl)

V_2 : Thể tích của vết mẫu tương đương với vết chuẩn (μl)

V_3 : Thể tích dung môi sử dụng để chiết mẫu (ml)

V_4 : Thể tích mẫu thu được qua các bước lọc mẫu (ml)

m : Khối lượng mẫu.

e) Khẳng định sự có mặt của Aflatoxin

Trên bản mỏng kích thước 10 $\times$ 10cm, người ta trừ ra đường giới hạn trên và bên mỗi cạnh 3cm (hình 2.5).

Bản mỏng được chạy chiều 1 với isopropanol: axeton : chloroform (3:10:87) tới khi đạt tới đường giới hạn được lấy ra làm khô bằng hơi ẩm để bốc hơi hoàn toàn dung môi.

- Phun lên bản mỏng dung dịch TFA có kích thước khoảng 5-10cm chiều dọc và 2cm chiều ngang để toàn bộ các điểm A, B, C được phun đều khoảng 2 ml dung dịch TFA.

- Để bản mỏng khô và sau đó dùng 1 bản kính sạch, ẩm đặt lên bản mỏng, sấy nhanh ở nhiệt độ 75°C trong 6 đến 8 phút.

- Làm lạnh bản mỏng trong 1 phút và tiếp tục chạy chiều thứ 2 với dung môi isopropanol:axeton:chloroform (6:10:84).

- Xem màu huỳnh quang dưới ánh đèn tử ngoại 365 nm:

+ Màu huỳnh quang màu xanh tại D' , E'.

+ Màu huỳnh quang màu xanh tại B', C' tương ứng với đồng phân Aflatoxin B₁ và M₁ sau khi phun dung dịch TFA.

+ Màu huỳnh quang màu xanh tại A₁ hoặc A'₁ bắt nguồn từ A có độ dài R_f tương ứng với độ dài R_f của B hoặc C.

Chương III

NHIỄM ĐỘC AFLATOXIN

3.1. SỰ CÓ MẶT AFLATOXIN TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI

Aflatoxin có mặt trong rất nhiều sản phẩm nông nghiệp, đặc biệt là các loại hạt có dầu như lạc, hạt bông, đậu tương và ngô (Blaney, 1985). Các loại hạt trồng ở vùng khí hậu nhiệt đới dễ nhiễm hơn các sản phẩm ở các vùng ôn đới như mạch, mỳ. Aflatoxin được sản sinh ra từ các nấm cúc vàng *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* trong quá trình bảo quản hạt ngũ cốc, tuy nhiên người ta cũng đã chứng minh được sự nhiễm Aflatoxin ngay trong quá trình thu hoạch, mặc dù hàm lượng Aflatoxin trong trường hợp này rất thấp.

Ở vùng Đông Nam Á và ở Úc, tỷ lệ nhiễm Aflatoxin trong các sản phẩm nông nghiệp rất đáng kể. Nhiễm Aflatoxin là do điều kiện bảo quản kém, sự xâm nhập của sâu mọt trong hạt bảo quản cũng như điều kiện thời tiết thuận lợi thúc đẩy sự lây lan, phát triển của *Aspergillus flavus* và sinh độc tố. Nấm *Aspergillus flavus* và Aflatoxin có thể tăng nhanh chỉ sau 3-7 ngày bảo quản. Ở Úc, người ta nhận thấy nguyên nhân chính trong bệnh Aflatoxin ở lợn là do không đảm bảo độ khô của hạt trước khi bảo quản. Các trường hợp nhiễm độc tố Aflatoxin ở lợn thường gặp vào thời gian từ tháng 3 đến tháng 8, khoảng 4

tuần sau khi thu hoạch nông sản. Như vậy thời gian từ 2-3 tuần đủ để cho nấm *Aspergillus flavus* phát triển và sản sinh độc tố. Kettener (1982) nhận thấy các trường hợp bệnh cấp tính đều do ăn phải thức ăn bị mốc như mì mốc hay bã lạc. Ở bang Queensland và một số vùng như Burbnett, Darling Dowa của Úc thường thấy nhiễm độc độc tố này.

Nhiễm độc Aflatoxin ở lợn là một vấn đề quan trọng, gây thiệt hại lớn về kinh tế. Ở khu vực Đông Nam Á, theo nhận xét của Ginting (1985), Widiastut (1988), ngô và thức ăn của gia cầm nhiễm tới 200 ppb Aflatoxin. Hàm lượng 200 ppb có thể là giới hạn gây độc tối thiểu cho gia cầm, song rất độc với vịt. Hàm lượng độc tố trên, cộng thêm nhân tố bất lợi "stress" là nguyên nhân giảm năng suất của chăn nuôi gia cầm. Ở Úc, từ năm 1971 đến 1988, trong 161 mẫu thức ăn cho gia cầm được phân tích có 43 mẫu chứa Aflatoxin và 4 mẫu đạt hàm lượng 50 ppb (Barry J. Balaney, Animal Research Institute, Yeerongpilly). Tại miền Bắc Carolina (USA), trong 278 trường hợp nhiễm độc Aflatoxin, 94 trường hợp tìm thấy Aflatoxin trong thức ăn. Hàm lượng trung bình ở thức ăn là 389 ppb và hàm lượng trung bình ở ngô sử dụng làm thức ăn là 518 ppb. Có 83 trường hợp ngộ độc ở lợn, 7 trường hợp ở bò và 4 trường hợp ở gia cầm (Smith, 1976).

Theo Choudary (1982) tại một trại nuôi gà thương phẩm ở Bangalore (Ấn Độ), gà bị nhiễm độc Aflatoxin gây thiệt hại về kinh tế nặng nề khi phân tích mẫu thấy trong ngô và khô dầu lạc dùng cho gà ăn chứa từ 1400-3600 ppb Aflatoxin (bảng 3.1, 3.2).

Bảng 3.1: Sự có mặt của Aflatoxin trong các nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi

(J.Vet. Malaysia, 1989 1(2): 79-82) từ 1981-1988

Loại thức ăn và nguyên liệu thức ăn	Số mẫu phân tích	Số mẫu có Aflatoxin	Tỷ lệ (%)	Hàm lượng Aflatoxin (ppb)
Thức ăn cho gia cầm	993	97	10	B ₁ : 5-320 B ₂ : 13-50 G ₁ : 10-160
Thức ăn cho vịt	282	20	7	B ₁ : 5-140 B ₂ : 8-14 G ₁ : 10-80
Thức ăn cho lợn	120	28	32	B ₁ : 140-400 G ₂ : 80-200
Thức ăn cho trâu bò	96	2	2	B ₁ : 20 G ₂ : 25
Thức ăn cho thỏ	33	2	6	B ₁ : 13-80 G ₂ : 10
Thức ăn cho ngựa	3	2	66	B ₁ : 80-160 G ₂ : 200
Ngô	48	1	42	B ₁ : 10-170 G ₂ : 200
Bột lạc	5	1	20	B ₁ : 80
Hạt hướng dương	2	1	50	B ₂ : 80
Bã dầu dừa	6	0	17	B ₁ : 10
Bã hạt cò	57	0	17	
Bột cá	34	0	17	
Đậu tương	19	0	17	
Hạt ngũ cốc	28	0	17	
Các loại khác	45	0	17	
Tổng số	1711	174	10	

Bảng 3.2: Tỷ lệ và hàm lượng Aflatoxin trong các mẫu nguyên liệu và thức ăn chăn nuôi

(Số liệu năm 1991 - Bộ môn Vệ sinh Thú y - Viện Thú y)

TT	Thức ăn và nguyên liệu	Số mẫu phân tích	Aflatoxin B ₁		Aflatoxin B ₂		Aflatoxin G ₁		Aflatoxin G ₂	
			Tỷ lệ (%)	Hàm lượng (µg/kg)	Tỷ lệ (%)	Hàm lượng (µg/kg)	Tỷ lệ (%)	Hàm lượng (µg/kg)	Tỷ lệ (%)	Hàm lượng (µg/kg)
1	Ngô hạt	24	33	10-409	8,3	10-20	16	10-20		
2	Ngô bột	21	74	25-250	9,5	10-20	51	10-20		
3	Bột sắn	10	30	10-40	60	40-200	60	40-250		
4	Bột cá	10	10	10-20	-	-	-	-	-	-
5	Khô dầu	21	85	10-160	28	10-40	57	10-100	14	10
6	Đậu tương	20	20	40-60	10	10-20	-	-	-	-
7	Cám gạo	20	25	10-80	10	10-20	10	20	-	-
8	Cám lợn tổng hợp	15	62	25-120	25	40-50	75	40-100	-	-
9	Cám gà tổng hợp	12	83	20-300	16	40-400	83	25-100	-	-
10	Cám gà con tổng hợp	15	66	10-250	20	20-80	20	10-100	-	-
	Tổng	168	44		14		36		2	

3.2. SỰ CÓ MẶT CỦA AFLATOXIN Ở NGÔ TRƯỚC KHI THU HOẠCH VÀ TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN

3.2.1. Một số nhân tố ảnh hưởng tới sự phát triển của *Aspergillus flavus* và sản sinh Aflatoxin ở ngô trước thu hoạch

a) Yếu tố độ ẩm

Người ta đã nghiên cứu vai trò của độ ẩm ảnh hưởng đến sự phát sinh và phát triển của *A. flavus* và sự hình thành Aflatoxin, đặc biệt lưu ý tới yêu cầu độ ẩm của nấm mốc đối với sinh lý của cây trồng. Có mối quan hệ giữa tình hình khô hạn kéo dài trong các vùng trồng ngô và sự có mặt của Aflatoxin B₁, nhiều tác giả đã tìm kiếm mối quan hệ này. Tuy nhiên chưa có những bằng chứng về lượng mưa và sự nhiễm Aflatoxin ở ngô trước thu hoạch. Có nhiều nhân tố có thể ảnh hưởng tới sự hình thành Aflatoxin một cách tổng hợp hay độc lập. Sự tồn tại và sống sót của bào tử nấm mốc có sự liên quan chặt chẽ tới môi trường như độ ẩm, nhiệt độ. Nói chung nếu như ở độ ẩm xác định thì sự tăng nhiệt độ có thể dẫn tới sự giảm thấp số lượng bào tử nấm *A. flavus*. Nếu độ ẩm là 75% và nhiệt độ môi trường là 29°C có thể dẫn đến làm chết bào tử. Tuy nhiên ảnh hưởng của thang độ ẩm tương đối gây chết lên sinh thái nấm *A. flavus* chưa được biết rõ và có thể có vai trò đối với sự sản sinh ra độc tố Aflatoxin như đã được điều tra ở một số vùng.

Người ta đã sử dụng phương pháp tính lượng nước hoạt động (a_w) tức là tỷ số giữa áp lực nước bốc hơi trong cơ chất với áp lực nước liên kết ở cùng một nhiệt độ và áp suất để đánh giá độ thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật. Sự nảy mầm và phát triển của nấm mốc nằm trong một thang nhiệt độ và nước hoạt động (a_w). Chỉ số a_w tối thiểu cho sự phát triển của nấm mốc là 0,78 và tối ưu là 0,98. Sự cân bằng cao nhất xảy ra ở chỉ số a_w thấp với nhiệt độ tối ưu là 33°C. Nhiều tác giả đã nghiên cứu vai trò của a_w đến sự phát triển, hình thành Aflatoxin. Ở chỉ số a_w cao, nhiệt độ tối ưu cho sự phát sinh và hình thành Aflatoxin rất khác nhau, phụ thuộc vào từng chủng *A. flavus*.

Ở a_w là 0,95 hay ít hơn, nhưng nhiệt độ thấp hoặc trung bình có thể ức chế hình thành Aflatoxin hơn ức chế sự phát triển của nấm mốc. Nhiệt độ và cơ chất có thể ảnh hưởng ưu thế hơn so với a_w . Khi a_w nằm trong khoảng 0,95-0,99 thì sự hình thành Aflatoxin phụ thuộc rất nhiều vào cơ chất hoặc vào các chủng nấm mốc trong điều kiện a_w tối ưu và nhiệt độ tối ưu. Do vậy có thể cơ chất, chủng nấm mốc và nhiệt độ quyết định a_w tối ưu.

Ở ngô bảo quản, độ ẩm ngô hạt phải đạt được hơn 16-17,5% mới đảm bảo cho sự phát triển của *A. flavus*. Tuy nhiên trên đồng ruộng, ngô bị nhiễm nấm mốc trong giai đoạn muộng khi hạt đã đông sũ lại có một lượng Aflatoxin cao hơn

ở mức thu hoạch. Sự nhiễm nấm mốc ở bắp ngô trên đồng ruộng cho thấy sự phát triển tối đa nấm mốc xảy ra ở thời kỳ cuối của dạng sữa và chuyển sang giai đoạn đầu của đông sữa. Sự nhiễm Aflatoxin đạt lớn nhất khi bắp ngô bị nhiễm nấm ở ngày thứ 21-42 sau khi hoàn chỉnh lớp bẹ giữa và thời kỳ thu hoạch ở tuần thứ 6-9 sau khi lớp vỏ đầu xuất hiện. Những nghiên cứu khác cho thấy khi vùng bắp bị nhiễm nấm khoảng 20 ngày sau khi hình thành bẹ giữa. Hàm lượng độ ẩm của ngô ở ngày từ 21 tới 42 ngày sau khi hoàn thiện lớp bẹ đầu tiên là 27-35%.

Các công trình nghiên cứu đều khẳng định không có mối quan hệ nào giữa việc tưới tiêu cho ngô với hàm lượng Aflatoxin sinh ra trước khi thu hoạch. Tuy nhiên người ta nhận thấy ở vùng khô cằn, ngô nhiễm lượng Aflatoxin cao hơn ngô ở vùng đất có khả năng giữ ẩm. Những nghiên cứu thực nghiệm trên các ruộng cũng thể hiện sự nhiễm Aflatoxin ở ngô cao hơn đối chứng. Các ruộng được tưới tiêu có hàm lượng Aflatoxin thấp hơn một cách có ý nghĩa so với ruộng không được tưới tiêu. Như vậy sự giữ được độ ẩm trong đất xem như là nhân tố góp phần làm giảm Aflatoxin ở ngô. Đó là những bằng chứng mạnh mẽ góp cho việc khẳng định giả thiết về ảnh hưởng của độ ẩm tới hình thành Aflatoxin.

Tuy nhiên cũng nhiều nghiên cứu cho thấy tưới tiêu không phải là biện pháp làm giảm Aflatoxin. Người ta đã thu

thập được các số liệu trong 5 khu vực được tưới tiêu cho thấy không có sự giảm lượng Aflatoxin mặc dù như vậy là đã làm giảm ảnh hưởng của độ ẩm. Một số tác giả cũng đã không đạt kết quả trên thực nghiệm nhiễm *A. flavus* và *A. parasiticus* trên vùng ngô được tưới tiêu để làm giảm Aflatoxin.

Vai trò của tưới tiêu có thể làm ảnh hưởng đến sinh thái *A. flavus* và lượng bào tử nấm mốc lưu hành. Các tác giả đã chứng minh được sự giảm một cách có ý nghĩa số lượng bào tử *A. flavus* trên các ruộng được tưới tiêu. Như vậy ý nghĩa của việc tưới tiêu không phải trực tiếp làm giảm hàm lượng Aflatoxin sinh ra mà chủ yếu là làm giảm lượng bào tử nấm mốc lưu hành và do đó cũng có thể làm giảm được Aflatoxin do nấm mốc sinh ra.

Vai trò ảnh hưởng của độ ẩm đối với sinh lý cây trồng và ảnh hưởng của nó đến sự hình thành Aflatoxin vẫn còn là vấn đề mới. Mặc dù nguyên nhân trực tiếp và mối quan hệ ảnh hưởng lẫn nhau là rất khó xác định, song cũng tìm thấy bằng chứng để chứng minh ảnh hưởng của độ ẩm và sự tăng lên hàm lượng Aflatoxin.

Những thay đổi sinh lý cây trồng như sự biến đổi vị trí cacbon hoặc nitơ hoặc hàm lượng của chúng trong hạt có thể dẫn đến sự có mặt của *A. flavus* và sự tổng hợp Aflatoxin. Sự tăng hàm lượng Aflatoxin liên quan đến thay đổi hàm lượng nitơ là quan trọng đối với sinh lý cây trồng.

b) Yếu tố nhiệt độ

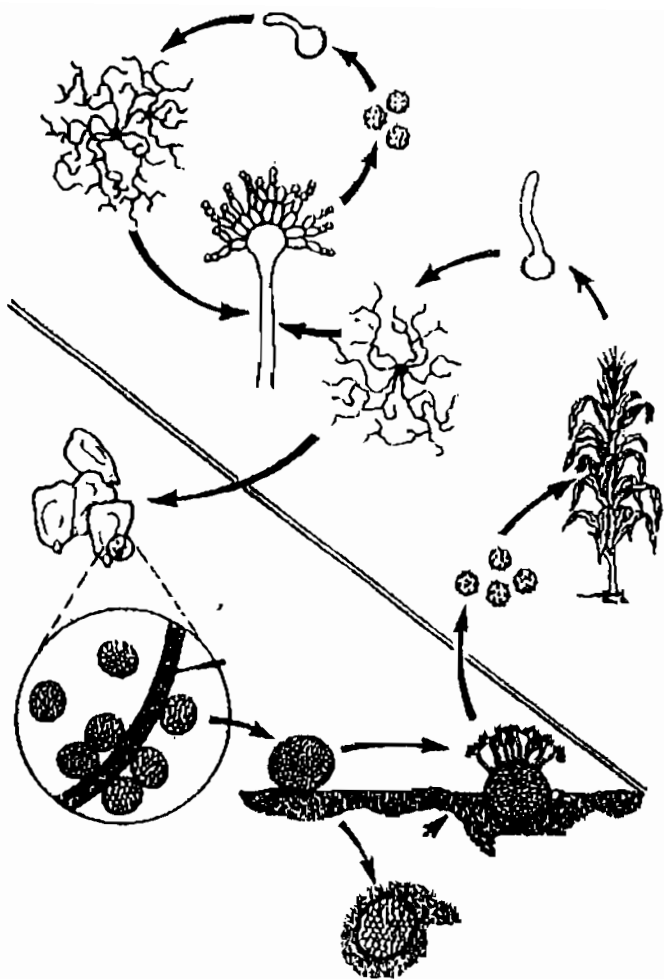
Nhiệt độ được xem như là yếu tố ảnh hưởng từ môi trường có tầm quan trọng nhất đối với sự phát triển của nấm *A. flavus* và hình thành độc tố Aflatoxin của chúng. Người ta thấy các nấm có nhiệt độ cao, khô hạn nhiều ảnh hưởng tới sự có mặt của Aflatoxin cao hơn ở ngô. Phần lớn các loài nấm mốc phát triển tốt ở nhiệt độ 20-30°C như *A. flavus*, nhưng có một số loài thang nhiệt độ rộng hơn và được xem như là nấm ưa nhiệt, vì nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của nó là 35°C. Người ta đã nghiên cứu thang nhiệt độ từ 2-52°C để tìm kiếm ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển và sản sinh Aflatoxin. Kết quả cho thấy sự hình thành Aflatoxin tối ưu ở 24°C trên môi trường nuôi cấy, nhưng nhiệt độ tối ưu thúc đẩy phát triển nấm mốc là 29-35°C. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của *A. flavus* là 30-40°C. Aflatoxin sản sinh ra trên môi trường gạo nuôi cấy nấm *A. flavus* đạt cao nhất ở 28-31°C. Trên môi trường lạc là từ 25-35°C sau 21 ngày nuôi cấy.

Sự sản sinh Aflatoxin trước khi thu hoạch ngô trong môi trường ít có sự thay đổi nhiệt độ. Người ta đã nghiên cứu sự biến động nhiệt độ đối với chủng nấm *A. parasiticus*. Kết quả cho thấy, nếu tăng nhiệt độ từ 15°C lên 21°C sau 24h nuôi cấy và sau đó là 28°C sau 48h nuôi cấy thì kết quả làm tăng hàm lượng Aflatoxin cao hơn nuôi cấy trong điều kiện giữ nguyên

nhệt độ 28°C. Nếu nuôi cấy ở thời gian ngắn với nhiệt độ cao từ 40-50°C sẽ làm giảm sự phát triển của nấm mốc và giảm khả năng hình thành Aflatoxin.

Tuy nhiên nếu nuôi cấy ở 24°C và có thời gian ngắn tiếp xúc với nhiệt độ thấp 10°C thì không tìm thấy có sự ảnh hưởng đến phát triển của nấm và sự hình thành Aflatoxin. Những nghiên cứu khác về nhiệt độ ảnh hưởng đến sự hình thành Aflatoxin B₁ hay G₁ của *A. flavus* cũng cho thấy nếu như nhiệt độ đó là từ 15-33°C thì Aflatoxin B₁ sản sinh ra nhiều hơn G₁ và nếu nhiệt độ đó là giữa 15°C và 25°C thì sự hình thành Aflatoxin G₁ nhiều hơn Aflatoxin B₁. Ảnh hưởng của nhiệt độ tổng số tính theo giờ nuôi cấy trên ngày cũng ảnh hưởng tới sự phát triển và hình thành Aflatoxin. Nếu nhiệt độ thấp hơn 208 độ giờ/ngày thì nấm mốc phát triển tốt, sản sinh các sắc tố và nếu nhiệt độ lớn hơn 270 độ giờ/ngày thì thúc đẩy tạo bào tử rất phong phú và sinh tổng hợp tối ưu Aflatoxin.

Nhiệt độ ảnh hưởng trực tiếp tới sự phát triển của *A. flavus* trên ngô. Nếu nhiệt độ đó từ 32-38°C thì sự nhiễm nấm *A. flavus* vào hạt ngô là thích hợp nhất. Nhân tố chủ yếu để nấm mốc xâm nhập vào hạt qua lớp bẹ là nhiệt độ. Nếu nhiệt độ cao hơn 30°C thì sự xâm nhập đó mạnh mẽ và sự ký sinh của *A. flavus* trở nên dễ dàng hơn.



Hình 3.1: Vòng tuần hoàn về quá trình hình thành và phát triển của *A. flavus* trên ngô trước thu hoạch

Sự hình thành bào tử trần conidi và hạch nấm (*Sclerotium*) trong đất và trên bắp ngô

3.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của *A. flavus* và sản sinh Aflatoxin trong quá trình bảo quản ngô sau thu hoạch

a) Yếu tố môi trường

Hai nhân tố quan trọng đến sự phát triển *A. flavus* trong ngô bảo quản sau thu hoạch là nhiệt độ và độ ẩm. Ngược lại với nhân tố nhiệt độ ảnh hưởng đến sự sản sinh độc tố Aflatoxin trước thu hoạch thì độ ẩm lại đóng vai trò quan trọng sau thu hoạch. Độ ẩm tương đối tối thiểu để nấm mốc phát triển sau thu hoạch là 85% (RH - Relative Hummidity). Các bào tử nấm mốc có thể nảy mầm được trong điều kiện có RH từ 81-82%. Tuy nhiên các nghiên cứu khác cho thấy phải cần RH đạt 85%. Nếu cơ chất là ngô và gạo thì cả hai loại ngũ cốc này có thể cần độ ẩm thấp nhất để nấm *A. flavus* phát triển và sản sinh độc tố Aflatoxin so với các cơ chất khác. Khi độ ẩm RH tăng lên trên 85% - điều đó cũng có nghĩa là sự phát triển của *A. flavus* cũng tăng lên một cách đáng kể. Như vậy nếu độ ẩm ở giới hạn này (RH) tăng lên một chút thì nguy cơ sự có mặt của Aflatoxin tăng lên. Hầu như chưa có giới hạn trên nào của độ ẩm được xác định có tác dụng ngăn cản sự phát triển của nấm mốc và sản sinh Aflatoxin trong môi trường nuôi cấy nhân tạo cung cấp khí đầy đủ, trừ khi dưới những điều kiện không bình thường. Tuy nhiên trong điều kiện tự nhiên, nếu độ ẩm quá cao sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của *A. flavus* do sự phát triển mạnh mẽ của các vi sinh

vật khác, ở hàm lượng độ ẩm cơ chất cao thì các loại nấm khác, nấm men và vi khuẩn sẽ phát triển lấn át *A. flavus* hoặc các vi sinh vật này tạo ra môi trường thiếu không khí sẽ hạn chế sự phát triển của *A. flavus* và sự sản sinh Aflatoxin.

Độ ẩm cơ chất trong quá trình bảo quản sau thu hoạch là nhân tố rất quan trọng. Nếu độ ẩm của hạt đạt 16%, nấm *A. flavus* khó có thể phát triển nhưng nếu độ ẩm lớn hơn 17%, nấm mốc đã bắt đầu phát triển tốt, ở hàm lượng độ ẩm từ 18-19%, *A. flavus* phát triển rất nhanh. Nhiều nghiên cứu chứng minh độ ẩm cơ chất cao là điều kiện thuận lợi cho nấm mốc phát triển. Aflatoxin sản sinh ra ở lúa mạch có độ ẩm là 24-26%, nhưng không sản sinh ở độ ẩm 20%. Aflatoxin có thể sản sinh ra ở ngô sau khi thu hoạch có độ ẩm từ 20-28%, đặc biệt khi nhiệt độ môi trường từ 20-30°C (bảng 3.3).

Ở nhiệt độ môi trường thấp tới 8°C, *A. flavus* vẫn có thể phát triển và người ta thấy chúng có thể vẫn sản sinh ra Aflatoxin. Nhiệt độ 11°C ở gạo và 14°C ở lạc có thể sản sinh được Aflatoxin do nấm *A. flavus* phát triển và phát sinh. Tuy nhiên ở nhiệt độ tối thiểu này *A. flavus* chỉ có thể sản sinh được Aflatoxin nếu như các yếu tố khác là tối ưu. Nhiệt độ từ 20-35°C là thích hợp nhất cho sự hình thành Aflatoxin. Ở nhiệt độ 37-43°C có thể là giới hạn tối đa để nấm *A. flavus* sản sinh được Aflatoxin, đặc biệt mới có nấm *A. flavus* phát triển được ở nhiệt độ từ 44-46°C.

Bảng 3.3: Khả năng sản sinh Aflatoxin trên ngô có độ ẩm khác nhau (Theo Sauer và Burroughs, 1980)

Độ ẩm trung bình của ngô (%)	Độ ẩm tương đối môi trường (%)	Lượng Aflatoxin B ₁ (mg/g)			
		14 ngày		28 ngày	
		Giống ngô 1	Giống ngô 2	Giống ngô 1	Giống ngô 2
16,5	84,2	ND	ND	ND	ND
16,7	85,1	ND	ND	ND	25
17,3	86,0	10	30	45	1100
17,6	86,9	25	750	150	1675
18,0	87,7	140	500	600	3375

ND: Không tìm thấy Aflatoxin.

Nếu cả độ ẩm, nhiệt độ và hàm lượng nước cơ chất tối ưu, thì sự hình thành Aflatoxin chỉ sau 48 giờ. Người ta thí nghiệm trên ngô có độ ẩm 21% được bảo quản trong chum ở 30°C, nếu dùng không khí lạnh bơm vào ngay thì nấm *A. flavus* ít phát triển và không hình thành Aflatoxin. Nhưng nếu bơm khí lạnh từ từ trong vòng 20 tới 40 giờ thì nấm *A. flavus* có thể phát triển và sản sinh ra Aflatoxin.

Thành phần khí quyển trong quá trình bảo quản cũng là những nhân tố làm giới hạn sự phát sinh và phát triển của nấm mốc. Nhiều thí nghiệm đã chứng minh khi CO₂ ở nồng độ cao hay khi O₂ ở nồng độ thấp đều có thể ức chế sự phát triển của

nấm mốc. Tác dụng này tới sự hình thành Aflatoxin mạnh hơn là sự ức chế phát triển nấm mốc.

b) Yếu tố thu hoạch và phơi khô

Quá trình thu hoạch và phơi khô hạt bảo quản có thể gây ra sự hư hại mang tính chất cơ giới đối với hạt và đó là nguyên nhân gây ra sự phát triển của nấm mốc trong đó có *A. flavus*. Dưới điều kiện môi trường thuận lợi, sự phát triển của *A. flavus* ở các hạt bị tổn thương này nhanh hơn nhiều lần so với hạt bình thường. Sự hư hại hạt như gãy, vỡ là do quá trình thu hoạch, tách hạt, phơi sấy gây ra và có thể còn do sâu mọt phá huỷ hạt. Người ta nhận thấy, nếu quá trình hư hại hạt xảy ra ở khu vực mầm hạt thì nấm mốc phát triển nhanh hơn là ở hạt. Vì vậy trong quá trình thu hạt phơi khô và bảo quản cần phải lưu ý những tổn hại này.

Nhiệt độ làm khô hạt cao có tác động tới sự phát triển *A. flavus* bởi vì nó sẽ có xu hướng làm giảm thấp hơn hàm lượng độ ẩm cân bằng. Thông thường với quá trình sấy khô nhân tạo, a_w hay RH đều có xu thế cao hơn so với sự làm khô trong tự nhiên dù sấy khô tới bất kỳ độ ẩm nào. Nhiệt độ sấy khô cao cũng có thể làm hạt bị chết, như vậy sẽ làm tăng tính miễn cảm của hạt đối với nấm mốc khi điều kiện ngoại cảnh bên ngoài không thuận lợi. Sự sấy khô ở nhiệt độ cao cũng có thể gây ra sự dễ vỡ của hạt so với làm khô trong tự nhiên. Một số nấm mốc và bào tử nấm mốc có mặt trên hạt sẽ bị diệt trong

quá trình sấy khô ở nhiệt độ cao. Tuy nhiên nếu như các loài nấm mốc bị tiêu diệt thì sau đó sự tái nhiễm lại có thuận lợi hơn đối với *A. flavus* vì thiếu sự cạnh tranh sinh vật và vì bản thân *A. flavus* là loài ưa nhiệt hơn (Thermotolerant). Nhưng sau khi bị tiêu diệt, cần phải có thời gian lâu dài hệ nấm mốc mới có thể được tái lập.

Làm khô ở điều kiện tự nhiên, nhiệt độ thấp có ưu điểm hơn là tiết kiệm được nhiên liệu và tránh được sự hư hại hạt trong quá trình sấy khô ở nhiệt độ cao.

Phơi khô ở nhiệt độ thấp, cần phải tiêu tốn thời gian nhiều ngày mới có thể dẫn đến lượng độ ẩm của hạt an toàn tránh sự xâm nhập của nấm mốc, nhưng trong quá trình đó lại nâng cao khả năng nấm mốc có thể xâm nhập và sản sinh Aflatoxin. Nếu nhiệt độ đó thấp hơn 20°C thì khả năng sản sinh Aflatoxin cũng rất hạn chế vì nấm *A. flavus* cũng không phát triển mạnh mẽ ở khu vực nhiệt độ này. Ở nhiệt độ cao hơn, mối nguy hiểm do nhiễm Aflatoxin tiềm tàng hơn.. Một số thí nghiệm cũng đã chứng minh rằng nếu làm khô ở nhiệt độ thấp thì sẽ tránh được sự nhiễm Aflatoxin.

Một cách khác để làm giảm sự xâm nhập của nấm mốc vào lớp trên của kho bảo quản là hệ thống trộn để bảo đảm tránh sự tập trung độ ẩm của hạt ở lớp trên. Người ta cũng còn có nhiều con đường khác để chống sự xâm nhập của nấm mốc vào hạt bảo quản như dùng các hoá chất và các biện pháp sinh học sẽ đề cập ở phần sau.

3.3. SỰ CÓ MẶT CỦA AFLATOXIN TRONG THỰC PHẨM (AFLATOXIN ĐỐI VỚI SỨC KHOẺ CON NGƯỜI)

Thông thường, ngộ độc Aflatoxin cấp tính ít khi gây chết người. Song trường hợp ăn phải Aflatoxin trực tiếp từ lạc, ngô hay gián tiếp qua thực phẩm rất đáng được quan tâm, vì nhiễm Aflatoxin mạn tính có thể gây bệnh ung thư gan ở người. Báo cáo của Saito (1976) về sự có mặt của độc tố nấm mốc trong thực phẩm liên quan đến bệnh ung thư gan ở Malaysia và Thái Lan cho biết, các trường hợp ung thư gan ở Thái Lan cao hơn ở Nhật và tỷ lệ ung thư gan cao nhất ở quần thể nam giới gốc Trung Quốc, vì quần thể này thường ăn gạo dầu và rau. Người gốc Malaysia hay ăn cá tươi, đậu và ớt. Người gốc Ấn Độ thường ăn sữa và sản phẩm của sữa, bột carry. Loài nấm sản sinh Aflatoxin là *Aspergillus flavus* được phân lập từ 13-21% trong các mẫu gạo. Bột carry thường nhiễm tỷ lệ cao chủng *Aspergillus flavus*. *Aspergillus flavus* còn thấy nhiều ở lạc, bột ngũ cốc, đậu tương và cá khô. Độc tố tách từ gạo và đậu rất độc với tế bào Hela. Trong 33 chủng nấm *Aspergillus flavus* phân lập được có 8 chủng sinh Aflatoxin, 3 trong 4 chủng *Aspergillus versicolor* sản sinh Sterigmatocystin. Những nghiên cứu ở Thái Lan cũng cho thấy *Aspergillus flavus* có mặt trong nhiều loại thực phẩm bán trên thị trường. Các chủng sinh Aflatoxin cũng có trong đất trồng trọt. *Aspergillus flavus* được phân lập từ 15 trong 50 mẫu đất ở Malaysia và 29 trong 106 mẫu đất ở Thái Lan, 16 chủng trong 44 chủng phân lập sản sinh Aflatoxin ở Philippin các sản phẩm công nghiệp dùng làm thức ăn như lạc,

gạo, đậu tương và cà phê cũng được xác định là nhiễm *Aspergillus flavus* và độc tố Aflatoxin ở các mức độ khác nhau (bảng 3.4 và 3.5).

Bảng 3.4: Sự có mặt của *Aspergillus flavus* và Aflatoxin ở các mẫu lạc (từ 1967-1983 ở Philippin)

Loại mẫu lạc	Tỷ lệ nhiễm <i>Aspergillus flavus</i> (%)	Hàm lượng Aflatoxin B ₁ (ppb)
Lạc còn tươi mới đào	5	14
Lạc ở trại, bảo quản trong các chum, kho	1	257
Lạc đã bóc vỏ từ các kho nông trại	45	964
Lạc còn trong vỏ	25	0
Nhân lạc bóc vỏ lựa	90	114

Bảng 3.5: Sự có mặt của *Aspergillus flavus* và Aflatoxin trong một số nông sản khác nhau (từ 1967 - 1982 ở Philippin)

Tên nông sản	Số lượng mẫu phân tích	Tỷ lệ nhiễm <i>A. flavus</i> (%)	Hàm lượng Aflatoxin B ₁ (ppb)
Cùi dừa bị mốc	20	100	314
Lúa miến trong đồng	44	25	208
Lúa miến bảo quản đã làm khô	30	0	0
Gạo chưa nghiền bị mốc	30	0	0
Gạo để 2 năm trong kho	40	2	5
Đậu tương khô	25	16	21
Hạt cà phê	27	41	150

Hội chứng Reyer (Reyer syndromes) ở trẻ em xuất hiện không chỉ ở Thái Lan mà còn ở Niu Zilân và ở Tiệp Khắc (Becroft, 1972, Dvorackova, 1977).

Hội chứng Reye là do nhiễm độc Aflatoxin qua thức ăn, dựa trên cơ sở phát hiện Aflatoxin trong huyết thanh, nước giải và những tổn thương ở gan của trẻ em bị bệnh này. Tuy nhiên, còn chưa đủ bằng chứng để kết luận chính xác nguyên nhân căn bệnh trên có phải do Aflatoxin trong thức ăn hay không?

Theo một báo cáo ở Ấn Độ (Krishnamachari, 1957; Nigindu, 1982), 272 bệnh nhân trong các bệnh viện có những dấu hiệu bệnh lý do nhiễm độc Aflatoxin. 27% trong số này bị chết. Còn ở Kênia, 60% trong 20 trường hợp được phát hiện đã bị chết.

Payet (1966) cho biết ở Xê-nê-gan nhiều trẻ em dưới 1 năm tuổi được ăn 70-140 g lạc/ngày trong 10 tháng liền để điều trị bệnh Kwashiorkor. Những mẫu lạc này sau đó phát hiện có chứa 500-1000 ppb Aflatoxin B₁. Như vậy trung bình một ngày một trẻ em đã phải ăn từ 35-140 ppb. Hai đứa trẻ trong số này mắc bệnh gan sau 4 đến 6 năm.

Các trường hợp nhiễm độc ở người do ăn phải Aflatoxin có trong thực phẩm, đặc biệt là ngô nhiễm hàm lượng cao đáng được quan tâm hơn lạc. Mặc dù lạc nhiễm Aflatoxin nhiều hơn ngô, nhưng người ta chỉ ăn lạc với lượng nhỏ, trừ một số nước ăn lạc khá phổ biến như Mô-dam-bic, Xê-nê-gan,

Xuđăng. Mối quan hệ giữa bệnh ung thư gan ở người sống tại các nước sản xuất lạc ở châu Phi và châu Á với lượng Aflatoxin có trong sản phẩm này đã nghiên cứu, song chưa thấy có sự liên quan chặt chẽ. Tuy nhiên việc giảm hàm lượng Aflatoxin có thể bị ăn phải là rất cần thiết. Những người công nhân làm việc trong dây chuyền chế biến lạc có thể nhiễm Aflatoxin qua hô hấp. Một kỹ sư hoá chất phụ trách khâu hấp tiệt trùng bột lạc bị chết và đã phát hiện được Aflatoxin B₁ trong tế bào phổi (Dvorackova, 1976).

Ở Hà Lan, những người công nhân làm việc ở nhà máy ép dầu lạc có thể tiếp nhận từ 0,039 ppb tới 2,5 ppb Aflatoxin trong một tuần lễ làm việc (Van Nieweenhuize 1973). Theo Baxter (1981) có sự nguy hiểm khi tiếp xúc với bụi lạc hay các sản phẩm nông nghiệp khác có chứa Aflatoxin, tuy mức độ nguy hiểm chưa được xác nhận.

3.4. ĐỘC TÍNH CỦA AFLATOXIN

3.4.1. Độc tính và liều LD₅₀ đối với vật nuôi

Aflatoxin là chất độc nguy hiểm đối với các loài gia súc, gia cầm và con người, tuy nhiên mức độ độc hoàn toàn khác nhau. Điều đó phụ thuộc vào giống loài, lứa tuổi, giới tính, đường xâm nhập, trạng thái sức khoẻ của cơ thể, môi trường và hàm lượng chất độc ăn phải. Aflatoxin có thể gây độc cấp tính và mạn tính. Aflatoxin gây độc với gan (Lancaster, 1961). Theo Butter (1963), Aflatoxin là chất gây ung thư gan (Liver-Carcinogens). Có thể sắp xếp thứ tự mẫn cảm của các

loài giống gia súc, gia cầm với Aflatoxin như sau: vịt > gà tây > gia cầm khác > gà và chó > lợn > bò sữa > bê > lợn vỗ béo > bò vỗ béo > cừu con.

Liều gây độc đã được xác định trên một số các loài vật nuôi cho thấy ở lượng 366 µg/kg thể trọng đã có thể gây chết 50% vịt con 1 ngày tuổi (bảng 3.6).

Bảng 3.6: Liều độc cấp tính của Aflatoxin với vật nuôi
(Theo Pier, 1981 và Cheeke, 1985)

Loài vật nuôi	Lứa tuổi hay trọng lượng	Liều cho ăn gây chết 50% (mg/kg) - LD ₅₀
* Rất mẫn cảm		
Vịt	1 ngày tuổi	0,36
Thỏ	3 tháng tuổi	0,30
Mèo	Trưởng thành	0,55
Lợn	Theo mẹ	0,62
* Mẫn cảm trung bình		
Chó	Trưởng thành	1,0
Ngựa	Trưởng thành	0,6-1,0
Bê	1 tháng tuổi	1,0-1,5
Gà tây	3 tuần tuổi	1,36
Chuột lang	250 gam	1,4
Cừu	Trưởng thành	2,6
Khỉ (cynomologus)	2 năm tuổi	2,2
* Tương đối kháng		
Gà con	1 tuần tuổi	6,5
Chuột cống	Trưởng thành	5,5-17,4
Khỉ (macaque)	3 năm tuổi	7,8
Chuột đồng (Hamster)	1 tháng tuổi	10,2

3.4.2. Các tổ chức mục tiêu tạo các Aflatoxin B₁ - ADN - ADDUCTS

Cũng như nhiều hoá chất gây độc khác, Aflatoxin B₁ được oxy hoá do các men Oxydaza đa chức năng có trong microsome của tế bào và lưới nội mô của các tổ chức mục tiêu như gan, thận và phổi. Nghiên cứu quá trình này trên động vật thí nghiệm (in vivo) đã chứng tỏ rằng có mối liên quan chặt chẽ về loài mẫn cảm và các tổ chức mục tiêu tấn công của chất độc và khả năng hình thành các khối u do các chất độc gây ra với tính cạnh tranh trong quá trình phân giải chất độc của mô mục tiêu để có thể chuyển Aflatoxin B₁ thành Aflatoxin B₁ - 2,3 Epoxi. Sản phẩm trung gian này có độc tính vì có thể tạo ra các đại phân tử kiểu như các ADN. Nghiên cứu cũng đã cho thấy có mối tương quan giữa độc tính của chất độc và loài mẫn cảm và tổ chức mục tiêu như ADN của tế bào gan đối với Aflatoxin B₁. Kết quả nghiên cứu in vivo cũng đã được chứng tỏ bởi những kết quả điều tra mang tính chất dịch tễ về mối quan hệ giữa bệnh ung thư gan và khả năng nhiễm độc Aflatoxin ở các quần thể cư dân khác nhau. Khi phân tích bằng sắc ký nước tiểu của người và gia súc nhiễm độc độc tố này, người ta đã phát hiện thấy Aflatoxin B₁ được đào thải dưới dạng Aflatoxin B₁ - N⁷ Guanin, sản phẩm trung gian chính do Aflatoxin B₁ - 2,3 Epoxi đã kết hợp với ADN trong cơ thể, sản phẩm này đã được chứng minh trong động vật thí nghiệm. Số lượng và sự tạo thành Aflatoxin B₁ - ADN Adducts trong gan. Điều này cũng đã được xác định qua phương pháp chuẩn độ bằng kháng thể đơn dòng trong mỗi

liên kết Aflatoxin B₁ - protein, phép thử có thể xác định một lượng Aflatoxin B₁ trong 10 triệu phân tử Nucleotit.

Người ta đã nghiên cứu sự gắn các chất độc hoá học có khả năng gây ung thư gan với các ADN ở quần thể cư dân có nguy cơ nhiễm độc qua nghiên cứu sự có mặt của chúng trong nhau thai phụ nữ. Nhau thai được đánh giá là tổ chức chứa nhiều men Oxydaza đa chức năng có thể phân huỷ nhiều chất độc hoá học có thể gắn với ADN để tạo thành các hợp chất trung gian đại phân tử.

Những hợp chất hoá học được biết có thể bị phân giải trong nhau thai bao gồm các Hydrocacbon thơm mạch vòng, các amin thơm và các dược chất steroid. Tuy nhiên người ta đã tập trung nghiên cứu nhiều về các quá trình phân giải chất độc bởi chức năng của nhau thai, còn sự hình thành các hợp chất với ADN và mối tương quan giữa chúng với mô con mẹ ít được nghiên cứu.

Trong những nghiên cứu ít ỏi về ảnh hưởng của nhau thai phân giải hay tạo thành các hợp chất ADN với các chất độc nấm mốc, người ta đã nghiên cứu quá trình này trên chuột nhắt có chữa và đã phát hiện thấy mối quan hệ giữa các hợp chất Aflatoxin B₁ - ADN - Adducts ở nhau thai và gan con mẹ. Tuy nhiên cũng không thành lập được công thức biểu diễn mối tương quan, song hàm lượng đó tăng dần theo liều lượng chất độc đưa vào và đồng thời cả nhau thai và ở gan đều tăng theo. Thí nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt có chữa vào ngày thứ 17 đã được thu nhận một liều Aflatoxin B₁ khác nhau từ 5-20 µg/kg trọng lượng. Sau 2-24 giờ chuột nhắt

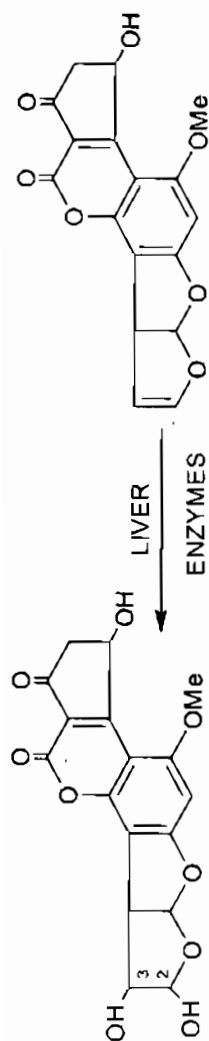
được giết để lấy tử cung và gan phục vụ cho nghiên cứu. Kết quả cho thấy ở hàm lượng từ 15-25 mg/kg trọng lượng Aflatoxin B₁, sự tạo thành Aflatoxin B₁ - ADN - Adducts ở nhau thai và ở gan là tương đương. Tuy nhiên ở giờ thứ 12 và 24, hàm lượng này tìm thấy ở nhau thai cao hơn ở gan con mẹ tương ứng là 25% và 68%.

Bảng 3.7: Mối tương quan về liều (dose) để hình thành Aflatoxin B₁ - ADN - Adducts trong gan và nhau thai chuột nhắt (Theo Irvin T.R., 1986)

Liều lượng Aflatoxin B ₁ (mg/kg)	ADN - Aflatoxin B ₁ trong nhau (picromol/mg ADN)	ADN - Aflatoxin B ₁ trong gan (picromol/mg ADN)
5	156 ± 2	502 ± 62
10	354 ± 64	1007 ± 167
15	1475 ± 25	1542 ± 145
20	2618 ± 4601	3226 ± 1351

*** Cơ chế và con đường gây độc cấp tính của Aflatoxin**

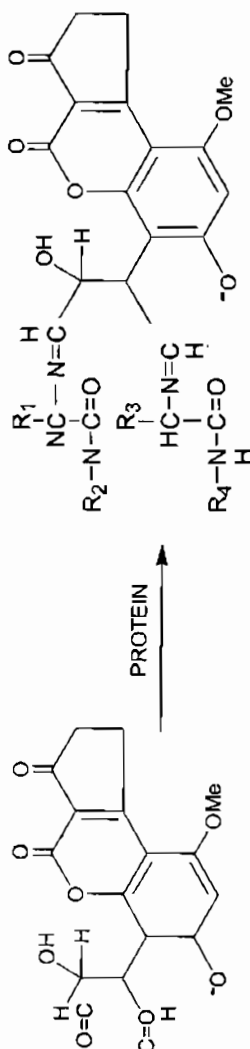
Để có thể gây độc đối với tế bào gan cũng như tạo khối u, Aflatoxin phải trải qua một quá trình biến đổi sinh học phức tạp, tạo thành dạng 2,3 - Dihydrodiol ở trong gan (Aflatoxin B₁ - dhd). Theo giả thiết của Neal và cộng sự (1981), hợp chất này được thử nghiệm về khả năng ức chế tổng hợp protein trong ống nghiệm (in vitro). Nguyên nhân gây chết là do gan bị huỷ hoại rất nhanh (necrosis). Sự miễn cảm của các loại vật nuôi khác nhau chính là nhờ quá trình chuyển hoá này. Ở đây



Aflatoxin B₁ - dhd

Aflatoxin B₁

Axit 11 Bazơ (pH = 7,4)



Di-aldehyd resonance hybrid

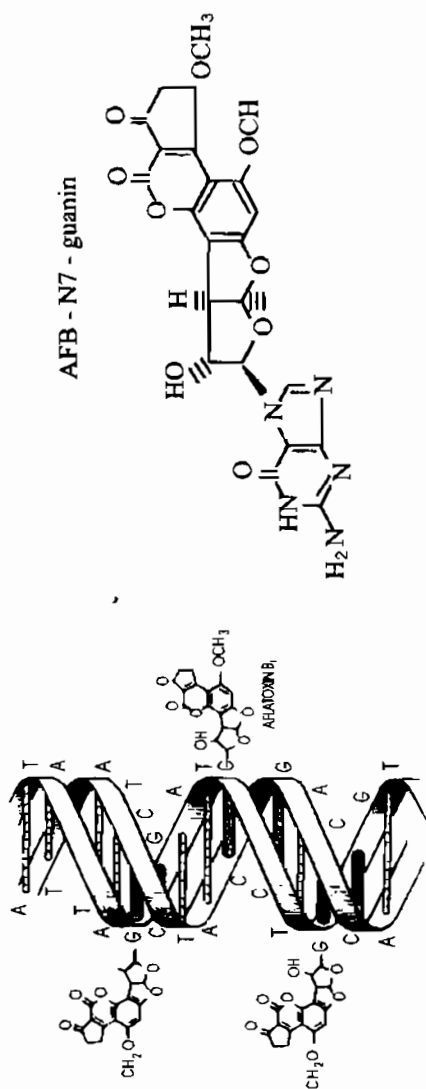
Shiff's base (hypoetical)

Hình 3.2: Cơ chế tác dụng của Aflatoxin B₁ ở mức tế bào gan (Cliford and Rees, 1967)

nhóm Dialdehyd phản ứng với nhóm amin của protein để tạo thành kiềm ship (Schiff's base). Các kiềm ship có thể ức chế sinh tổng hợp ADN và gây ra nhiễm độc cấp tính. Như vậy Aflatoxin G₁ cũng có thể tạo thành kiềm ship. Song các Aflatoxin B₂, G₂ không thể trực tiếp tạo thành các kiềm ship, chúng không thể bị oxy hoá để tạo thành dạng dihydrodiol được, do đó giải thích tạo sao Aflatoxin B₂ và G₂ lại ít độc hơn Aflatoxin B₁ và G₁ (hình 3.2).

*** Cơ chế gắn Aflatoxin vào chuỗi ADN**

Để gây được ung thư, Aflatoxin phải xâm nhập được vào các gen di truyền, làm thay đổi mật mã di truyền, tạo ra sự phân chia bất bình thường của tế bào. Ueno (1980) khi gây u ở động vật thí nghiệm đã nhận thấy, lượng Aflatoxin B₁ gắn vào các chuỗi ADN đã phản ánh tính miễn cảm của loài với khả năng tạo khối u. Cơ chế gây khối u chưa hoàn toàn được biết đến, song có thể thấy vai trò quan trọng của 2,3 Epoxi như một nhân tố tác động. Như vậy, nó phải được hình thành trong quá trình chuyển hoá của cơ thể, cụ thể sự chuyển hoá Aflatoxin B₁ thành dạng Aflatoxin - dhd, hoạt chất này chuyển hoá nhanh sang dạng 2,3 Epoxi. Trong các Aflatoxin thì Aflatoxin B₁, G₁ và M₁ có thể biến đổi trực tiếp thành dạng 2,3 Epoxi. Nhưng Aflatoxin B₂, G₂ chuyển thành dạng này cần trải qua các quá trình trung gian khác nhau. Quá trình liên kết giữa Aflatoxin B₁ với 2,3 epoxi xảy ra ở vị trí 7N Guanin của chuỗi ADN. Đây là một liên kết đồng hoá trị rất bền vững, kết quả dẫn đến làm ức chế hoặc sai lệch sinh tổng hợp protein do "sao chép" sai lệch của ADN (Cliford, 1967) (hình 3.3).



Hình 3.3: Cơ chế gắn Aflatoxin vào chuỗi ADN (Hsieh, 2000)

ADN mất khả năng nhân đôi là do tác động của Aflatoxin. Các hợp chất đa vòng, trong đó có Aflatoxin thường tạo thành một cấu trúc hình dẹt, một mặt phẳng có độ dày thích hợp với độ dày của một cặp bazơ trong cấu trúc ADN ($\approx 3,4 \text{ \AA}$), do đó dễ xen vào chuỗi xoắn kép ADN. Quá trình xen kẽ này cần kết hợp với một liên kết bền vững (liên kết đồng hoá trị) giữa phân tử Aflatoxin ở vị trí 2,3 Epoxi với ADN ở vị trí 7N Guanin. Không có gì thay đổi ở chỗ Adenin và Thimin.

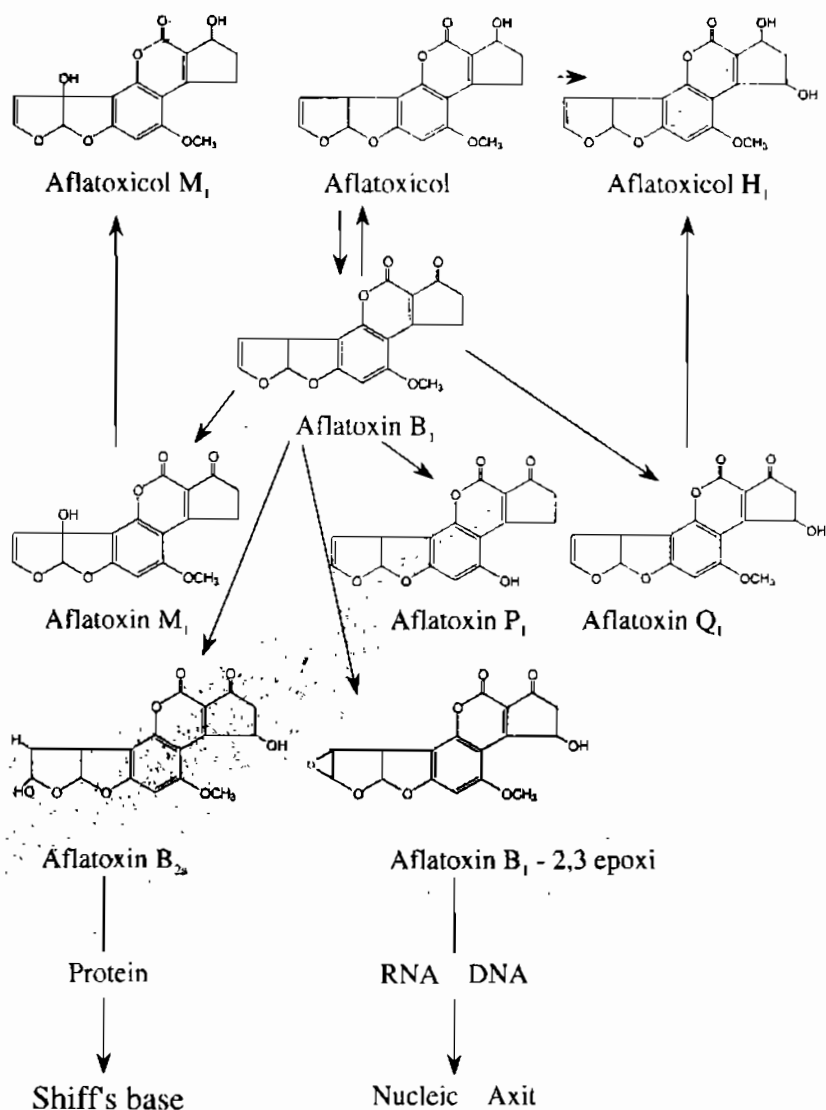
3.4.3. Chuyển hoá Aflatoxin trong cơ thể

Quá trình chuyển hoá Aflatoxin trong cơ thể cũng rất phức tạp, xảy ra do tác động của các men phân giải chủ yếu ở gan, tạo thành nhiều hợp chất khác nhau. Có những chất phân giải độc như Aflatoxin M₁ qua sữa, Aflatoxin B₁ kiềm ship có thể kết hợp với protein hoặc Aflatoxin B₁ - 2,3 Epoxi kết hợp với ADN, Aflatoxin P được phát hiện ở nước tiểu và nhiều hợp chất khác.

Chuyển hoá Aflatoxin B₁ trong cơ thể (theo Patters và Robert, 1971):

Các chất chuyển hoá được đào thải ra khỏi cơ thể. Con đường chính là qua gan ra mật và đào thải qua phân, hoặc qua thận theo đường bài tiết nước tiểu. Quá trình đào thải xảy ra nhanh chóng, nếu như không còn nguồn cung cấp thêm độc tố.

Aflatoxin B₁ và B₂ được phân giải nhờ men Nicotamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP) để tạo thành Cytopentenol và Aflatoxicol (hình 3.4).



Hình 3.4: Sự chuyển hoá Aflatoxin B₁ trong cơ thể
(Patterson và Roberts, 1971)

Một số nghiên cứu cho chuột uống và tiêm vào phúc mạc Aflatoxin B₁ cũng phát hiện được trong gan chuột cả Aflatoxin B₁ và M₁ (Cliford, 1965; Allcroft, 1966). Tiêm vào phúc mạc cừu với liều lượng 1 mg/kg thể trọng hỗn hợp Aflatoxin B₁ = 36%; G₁ = 52%; B₂ = 3% và G₂ = 2%. Sau 2 giờ giết cừu tìm thấy Aflatoxin M₁ trong gan, thận, nước tiểu, nhưng ít ở gan, nhiều ở thận và nhiều nhất trong nước tiểu. Nabney (1966) đã nhận thấy tỷ lệ đó như sau:

- Khoảng 90% Aflatoxin bài tiết qua sữa và nước tiểu trước 48 giờ.
- Sau 6 ngày không phát hiện được Aflatoxin trong sữa.
- Sau 8-9 ngày không còn độc tố trong phân và nước tiểu.
- Khoảng 0,55% Aflatoxin B₁, 6,53% Aflatoxin G₁ không biến đổi trong phân, 5,95% Aflatoxin G₁ không biến đổi trong nước tiểu.
- Aflatoxin M₁ đào thải chủ yếu qua 3 đường: phân, nước tiểu, sữa.

Nếu trong thức ăn của gà có Aflatoxin thì độc tố tồn dư trong gan và thịt gà có thể phát hiện được đến ngày thứ 8 kể từ lúc ngừng cho thức ăn. Gà ăn thức ăn nhiễm Aflatoxin trong thời gian dài thì tồn dư độc tố trong thực phẩm sẽ rất nguy hiểm đối với sức khỏe con người (Kozhenikov, 1989) (hình 3.4).

3.4.4. Tính chất gây suy giảm miễn dịch

Nhiều tác giả đã chứng minh Aflatoxin gây suy giảm miễn dịch ở cơ thể. Nhiễm độc Aflatoxin trong thức ăn có

mối quan hệ chặt chẽ với sự tăng tính miễn cảm với các bệnh truyền nhiễm khác. Ở gà dò có sự miễn cảm với bệnh cầu trùng (Coccidiosis), tỷ lệ gà nhiễm Salmonella cao hơn, hoặc tăng cảm nhiễm bệnh viêm túi Fabricius do virus (bệnh Gumboro). Nhiều nghiên cứu ở gà được ăn khẩu phần có chứa Aflatoxin các liều khác nhau đã ảnh hưởng tới hiệu giá kháng thể HI khi dùng vaccin phòng bệnh Newcastle (bảng 3.8).

Bảng 3.8: Ảnh hưởng của Aflatoxin B₁ đối với hiệu giá kháng thể HI ở gà được miễn dịch bằng vaccin Latosa chủng bệnh Newcastle
(Luận văn Tiến sĩ Khoa học Thú y của Nguyễn Hữu Nam, 1999)

Lô thí nghiệm	Hàm lượng Aflatoxin (ppb)	Thời gian xét nghiệm (ngày)	Hiệu giá kháng thể HI						Log HI
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
Đ/c	0	42	0	0	6	8	2	2	4,0
1	100	-	0	0	8	8	2		3,67
2	200	-	2	6	8	2	0		2,55
3	300	-	2	8	6	2	0		2,44
4	500	-	8	6	2	2	0		1,89
5	1000	-	11	5	2	0	0		1,5
6	1500	-	8	3	1	0	0		1,42

Gà Tây được dùng vaccin phòng bệnh tụ huyết trùng (*Pasteurella multocida*) đã không có miễn dịch khi thử thách

với chúng gây bệnh và tăng tính miễn cảm với bệnh Coccidiosis gây ra bởi *Eimeria adenolidis*. Suy giảm miễn dịch trong trường hợp nhiễm độc Aflatoxin được giải thích do độc tố làm teo túi Fabricius, tuyến Thymus và lách. Sự hấp thu và thải sắt bị giảm sút ở gà dò dẫn đến thiếu máu, tổng số bạch cầu tăng.

Cơ thể suy giảm sức đề kháng còn do giảm protein huyết thanh trong đó albumin bị ảnh hưởng hơn cả. α , β và γ globulin đều giảm, IgG bị ảnh hưởng hơn IgM. Lipoprotein carotenoid, cholesterol, triglyceric, uric axit, canxi, lactat cũng bị giảm.

3.4.5. Đặc tính gây ung thư gan

Aflatoxin đã được nghiên cứu và chứng minh là tác nhân gây ung thư ở động vật thí nghiệm và vật nuôi. Bằng chứng này được hai tổ chức thuộc Trung tâm nghiên cứu ung thư môi trường thế giới (IARC, 1972, 1976 và 1979) cũng như Tổ chức y tế thế giới (WHO, 1979) ghi nhận. Thử nghiệm gây các khối ung thư gan, thận, ruột được tiến hành ở chuột nhắt, chuột cống trắng, cá, vịt, khỉ bằng cách cho ăn (bảng 3.9).

Nghiên cứu về dịch tễ học cho thấy, cũng có một số quan hệ giữa hàm lượng Aflatoxin ăn phải trong khẩu phần và quần thể sinh vật với tỷ lệ ung thư gan. Tuy nhiên những nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm kiếm mối nguy cơ mang đến cho con người chưa thực hiện được, vì vậy chỉ mới coi Aflatoxin là có chứng cứ trong bệnh ung thư gan ở vật nuôi, đối với con người hãy còn là giả thuyết (IARC, 1979).

Bảng 3.9: Khả năng gây ung thư gan của Aflatoxin ở động vật thí nghiệm (Carnaghan, 1967)

Loài vật thí nghiệm	Liều đưa vào (ppb)	Thời gian nuôi dưỡng (tháng)	Xuất hiện khối u	Tần suất (%)
Vịt con	30	14	8/11	72
Cá hồi	8	12	27/65	40
Khỉ	100-800 mg tổng số	> 24	3/42	7
Chuột cống trắng	100	54-88 tuần	28/28	100
Chuột nhắt	150	80 tuần	0/60	0
Chuột chù	24-66 mg tổng số	36	9/12	75
Khỉ đuôi sóc	5mg tổng số	24	2/3	65

Những thí nghiệm xác định mối quan hệ giữa hàm lượng Aflatoxin có trong thức ăn và khả năng gây ung thư gan được xác định ở chuột cống trắng đực (bảng 3.10).

Bảng 3.10: Liều tác dụng của Aflatoxin B₁ đối với chuột cống trắng đực

Hàm lượng Aflatoxin trong thức ăn (ppb)	Thời gian nuôi (tuần)	Tần suất gây ung thư gan
0	74-109	0/18
1	78-105	2/22
5	65-93	1/22
15	69-96	4/22
50	71-79	20/25
100	54-88	28/28

Nghiên cứu của Mantel, Bryan và các số liệu thu được từ 5 nghiên cứu khác cho thấy, khả năng gây ung thư của Aflatoxin liều 0,1 ppb ở chuột là 240/1.000.000. Có sự khác biệt giữa loài, lứa tuổi, giới tính về độ mẫn cảm. ví dụ: chuột cống cái kháng với Aflatoxin. Điều kiện chăm sóc, nuôi dưỡng, khẩu phần ăn, khu vực cũng là những nhân tố góp phần thúc đẩy sự hình thành các khối ung thư (Roger và Newberne, 1971). Người ta nhận thấy ở các khu vực có nhiều ánh sáng mặt trời thì tỷ lệ người bị bệnh ung thư cao hơn ở các vùng khác. Chuột được chiếu xạ sau khi nhận được liều thấp Aflatoxin B₁ đã giảm tần suất xuất hiện các khối u. Nếu đồng thời sử dụng Aflatoxin và Riboflavin có thể làm giảm khả năng xuất hiện các khối ung thư (Joseph, 1976).

Bảng 3.11: Mối quan hệ giữa lượng Aflatoxin có thể được ăn vào ở các vùng khác nhau và các trường hợp ung thư gan ở người (Stoloff, 1976)

Nước	Khu vực (địa phương)	Lượng Aflatoxin có thể đưa vào (µg/kg P/ngày)	Trường hợp mắc bệnh ung thư	Tần xuất xuất hiện/10 ⁵ quần thể/năm
Kênia	Vùng cao	3,5	4	1,2
Xoadilon	Vùng cao	5,1	11	2,2
Thái Lan	Vùng Songkhula	5,0	2	2,0
Kênia	Vùng trung du	5,9	33	2,5
Xoadilon	Vùng trung du	8,9	29	3,8
Kênia	Vùng thấp	10,0	49	4,0
Xoadilon	Vùng Lambombo	15,4	4	4,3
Thái Lan	Vùng Ratbari	45,0	6	6,0
Xoadilon	Vùng thấp	43,1	42	9,2
Môdambic	Inhambance	222,4	460	13,0

Nghiên cứu của Stoloff (1976) về mối liên quan giữa hàm lượng Aflatoxin trong khẩu phần thức ăn và tỷ lệ mắc bệnh ung thư gan ở người tại các khu vực khác nhau đã chứng tỏ sự tương quan đó rất lớn (bảng 3.11). Tỷ lệ bệnh còn liên quan đến hàm lượng Aflatoxin trong các loại ngũ cốc được bán trên thị trường dùng làm thực phẩm cho người và thức ăn cho vật nuôi. Kết quả cho thấy ở các nước nhiệt đới hàm lượng Aflatoxin trong thực phẩm (bảng 3.12) cao hơn ở các nước ôn đới. Người ta cũng đã tìm thấy Aflatoxin trong các mẫu phân người sau khi ăn thực phẩm trên.

Bảng 3.12: Mối quan hệ giữa ung thư gan nguyên phát và lượng ngô ăn hàng ngày ở một số vùng khác nhau của Philippin (Theo Jayme và cộng sự, 1976)

Vùng	Tỷ lệ bị ung thư nguyên phát (trên 100.000 dân)	Lượng ngô tiêu dùng hàng ngày (g)
Vùng Đông Visayas	8,5	147,2
Vùng Tây Nam Mindanao	7,1	102,0
Vùng Đông Bắc Mindanao	6,4	84,6
Vùng Tây Visayas	5,6	77,7
Vùng Nam Tagalog	4,1	2,1
Vùng Bicol	3,7	35,5
Vùng Ilococ	3,3	5,5
Thung lũng Cagayan	2,9	71,8

3.4.6. Đặc điểm của ung thư gan

Ung thư gan do Aflatoxin gồm các dấu hiệu sau:

- Phát sinh vô tổ chức
- Sự thâm nhiễm
- Di căn tế bào

Theo định nghĩa trên thì sự tăng sinh tế bào có thể phát sinh một khối u lành gồm những tế bào giống hệt nhau hoặc u ác tính nếu các tế bào không giống nhau, tăng sinh vô tổ chức. Tế bào này phát triển nhanh hơn, thâm nhiễm vào các tế bào bên cạnh, tách ra theo đường lympho hoặc mạch máu, tràn vào các tổ chức khác để hình thành một khu vực phát triển mới (di căn). Quá trình ung thư gan cũng xảy ra như trên. Những khối u trong ung thư gan có đường kính khoảng 1cm, xuất huyết và hoại tử. Xét nghiệm mô học phát hiện thấy những di căn khu vực, biến đổi tế bào, mất tính phân cực và nhiều giai đoạn gián phân.

Trong tế bào gan xuất hiện những tế bào khổng lồ (Megalocytes) với nhân sưng to, có thể là tế bào ác tính, tế bào thoái hoá hoặc có sự biến đổi tế bào nhu mô. Những tế bào ung thư dạng tiểu thể có khả năng phân chia rất mạnh, giống như tế bào ban đầu của mô phân sinh. Nhưng trong các tế bào đó rất ít thấy sự phân bào gián phân. Trong những thí nghiệm trên động vật, lượng tế bào khổng lồ đó giảm dần khi lượng chất độc cho động vật ăn giảm.

Khối ung thư gan do Aflatoxin liều 2-4 mg cũng giống khối u do một số hoá chất khác gây nên như CCl_4 (Tetraclorua cacbon), DMN (Dimethyl nitrozamin). Cả hai chất này làm hoại tử gan ở khu vực trung tâm nhiều hơn ngoại vi. Các tổn thương không làm rối loạn cấu trúc gan.

Các alkaloid đặc biệt là alkaloid của cỏ lưỡi chó Senecio, chất Lazioclapin, Retriocxin gây hoại tử ở giữa tiểu thùy gan chuột khi nhiễm độc cấp tính. Khi không còn độc tố thì gan cũng không hồi phục được trạng thái bình thường.

Như vậy nhiều chất độc gây ung thư gan và hoại tử gan đều xuất phát từ khu vực giữa tiểu thùy, còn Aflatoxin gây hoại tử quanh cửa. Những tổn thương do Aflatoxin và cỏ lưỡi chó đều không thể hồi phục được.

Tác động của Aflatoxin lên tế bào gồm một số giai đoạn sau:

- Tác động trực tiếp lên ADN và ức chế các Polymeraza chịu trách nhiệm sinh tổng hợp ADN và ARN.
- Đình chỉ sinh tổng hợp ADN.
- Tiêu giảm sinh tổng hợp ARN và ức chế ARN thông tin.
- Biến đổi hình thái hạt nhân.
- Giảm thiểu tổng hợp protein.

Tác động qua lại với ADN chủ yếu là qua vòng Purin. Người ta đã dùng phương pháp phổ quang học để xác định sự gắn Aflatoxin vào vòng Purin. Ngoài ra Aflatoxin có thể kết hợp lỏng với ADN chuỗi đơn, dẫn đến ức chế tổng hợp ADN và ARN.

Do quá trình kết hợp giữa Aflatoxin với chuỗi xoắn kép ADN nên tổng hợp ADN bị đình trệ. Sự kết hợp này cũng giống như sự tương tác của chất Actinomycin. Chất Quinon và Amin cho phép chúng có thể xen vào phân tử ADN qua nhóm Guanin, không phải ở nhóm Adenin và Thimin.

Ngoài ra Aflatoxin còn ức chế hệ men của tế bào, đặc biệt là ADN - polymeraza. Loại men này giảm dần về số lượng, chỉ còn khoảng 60% trong thực nghiệm với E. coli do tác động vào ADN dẫn tới việc sao chép ARN thông tin trong nguyên sinh chất và hạt nhân bị tiêu giảm. Thí nghiệm được chứng minh sau 15 phút tác động của Aflatoxin thì sinh tổng hợp ARN chỉ còn 5-10%.

Hai quá trình trên dẫn tới sự giảm protein. Sự ức chế và giảm tổng hợp ARN dẫn tới rối loạn và giảm tổng hợp ARN của nguyên sinh chất tế bào, làm mất khả năng thông tin tái tổ hợp protein trong nguyên sinh chất tế bào.

Thử nghiệm tiến hành trên *Flavobacterium auraticum* (bảng 3.13).

Bảng 3.13: Tỷ số trung bình sau 3 lần quan sát ADN, ARN và protein trong 10ml môi trường, sau nuôi cấy 4 giờ

Aflatoxin B ₁ /ml	ADN	ARN	Protein
0	33	70	190
10	27	60	190
25	21	60	180
50	0	60	170
100	0	50	165

3.5. BỆNH NHIỄM ĐỘC AFLATOXIN Ở VẬT NUÔI (AFLATOXICOSIS)

Bệnh nhiễm độc Aflatoxin ở vật nuôi rất phổ biến, đặc biệt ở các nước nhiệt đới, do thức ăn chăn nuôi chứa Aflatoxin đã không được phân tích xác định trước. Các trường hợp ngộ độc quan sát được cho thấy, tất cả loài vật nuôi như gà, vịt, gà Tây, lợn, bò v.v... đều bị ảnh hưởng bởi Aflatoxin. Trong các cơ sở chăn nuôi tập trung, các giống gia súc và gia cầm ngoại nhập có năng suất cao thường xuất hiện ổ dịch liên quan tới Aflatoxin. Nguyên nhân chính là do thức ăn dự trữ nhiều dễ bị nhiễm nấm và độc tố của chúng.

Trong những năm gần đây, khi công nghiệp chăn nuôi tập trung phát triển, nhiều các vụ gây chết vật nuôi đã không tìm được nguyên nhân bởi các chẩn đoán chỉ tập trung vào các nguyên nhân bệnh truyền nhiễm. Tới những năm 60 của thế kỷ này khi hàng trăm nghìn gà tây ở Anh bị chết nên tình cờ người ta phát hiện Aflatoxin.

Như vậy dấu hiệu đặc trưng của nhiễm độc độc tố nấm mốc nói chung và nhiễm độc Aflatoxin là không có những dấu hiệu đặc biệt. Chính vì thế các thú y viên không phải là người đầu tiên phát hiện được nguyên nhân gây chết vật nuôi do chất độc nấm mốc mà là các nhà hóa học.

Trong trường hợp nhiễm độc không gây chết ở vật nuôi, các biểu hiện triệu chứng lâm sàng kém phát triển, giảm sức sản xuất trứng, sữa, giảm tăng trọng và chuyển hóa thức ăn,

mà các dấu hiệu đó thường không chỉ đặc trưng cho nhiễm độc tố. Chỉ sau khi phát hiện bệnh nhiễm độc Aflatoxin ở gà tây, người ta mới tổng kết xây dựng một vài dấu hiệu phân biệt bệnh này với các bệnh truyền nhiễm và trúng độc khác (bảng 3.14). Tuy nhiên các dấu hiệu nhận biết lại phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó phải kể đến hàm lượng của chất độc ăn phải và thời gian kéo dài. Như thế sự chẩn đoán phân biệt có thể khác nhau từ trường hợp này đến trường hợp khác.

Cho đến nay, phần lớn các tư liệu về nhiễm độc Aflatoxin tập trung chủ yếu vào chăn nuôi gia cầm. Lý do có thể không phải gia cầm mẫn cảm với Aflatoxin hơn là các loài vật nuôi khác trừ vịt con. Song ở gà công nghiệp người ta thấy có những dấu hiệu bệnh lý liên quan tới nhiễm độc Aflatoxin, mặc dù chúng vẫn khỏe mạnh. Đó là hội chứng xanh tím và chảy máu khiến cho chất lượng hàng hóa bị giảm sút và đặc biệt người tiêu dùng không có cảm tình với loại thực phẩm này. Hơn nữa trong chăn nuôi gà, màu vàng trên da và trong lòng đỏ trứng rất hấp dẫn người tiêu dùng, thì màu sắc này lại bị tác động làm giảm đi đáng kể bởi sự có mặt của Aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi.

Nguyên nhân dẫn đến ảnh hưởng trên là do Aflatoxin đã làm tăng tính dễ vỡ của lớp mao quản, cũng như làm mất chức năng là lớp đệm lót cho mạch quản khi có những tác động cơ giới. Mặt khác Aflatoxin cũng gây ra sự ức chế quá trình đông máu, làm tăng hoạt tính của prothrombin do đó sự chảy máu trở nên liên tục không dừng.

Bảng 3.14: Ảnh hưởng của Aflatoxin có trong thức ăn đến các biểu hiện bệnh lý ở vật nuôi (Allcroft, 1969)

Loại gia súc	Lượng Aflatoxin trong thức ăn hàng ngày	Thời kỳ nuôi dưỡng (tuần)	Tổn thương gan	Ảnh hưởng tới phát triển và hiệu quả thức ăn
Lợn (20-70kg)	0,14 0,28 0,41	12 12 12	Trung bình Nhẹ Nhẹ	Bình thường Giảm sút Giảm sút
Lợn (40-100kg)	0,28 và 0,41	20	Nhẹ	Giảm sút
Lợn (70-100kg)	0,69	7	Trung bình	Bình thường
Lợn nái (có chữa)	0,3-0,55	4	Rõ	Suy giảm và một số con chết
Gà Tây (1 ngày tuổi)	0,25	4	Rõ	Chậm phát triển và giảm trọng lượng
Gà thịt (broiler) (1 ngày tuổi)	0,2 0,42 0,5	7 7 7	Nhẹ Nhẹ Nặng	Giảm trọng lượng trong 3 tuần
Vịt (7 ngày tuổi)	0,03	4	Đặc tính điển hình nhiễm độc Aflatoxin	Giảm trọng lượng, chết 50%
Bê (4 ngày tuổi)	0,2	16	Trung bình	Giảm trọng lượng từ 0 đến 3 tháng
Bê vỗ béo (6 tháng tuổi)	0,66	20	Trung bình	Bình thường
Bò sữa	1,5	4	Trung bình	Giảm lượng sữa; Aflatoxin M ₁ có trong sữa

Hơn thế nữa Aflatoxin can thiệp vào quá trình hấp thụ, chuyển hóa và đào thải caroten một chất màu có trong thức ăn góp phần tạo màu vàng của da và lòng đỏ trứng. Quá trình hấp thụ chất caroten cũng là nguyên nhân gây hội chứng xanh tím trong mô bào của gia cầm.

Bên cạnh đó sự suy giảm hàm lượng lipit được hấp thụ từ thức ăn do ảnh hưởng của Aflatoxin cũng dẫn đến là giảm chất lượng thịt. Người ta thấy hàm lượng lipit trong phân của vật nuôi bị nhiễm độc Aflatoxin cao hơn gấp 10 lần hàm lượng lipit trong phân của vật nuôi được ăn thức ăn không có Aflatoxin. Lý do Aflatoxin đã ảnh hưởng đến men lipaza của tuyến tụy, làm giảm hàm lượng men này. Aflatoxin còn tác động tới số lượng và chất lượng mật - một nhân tố quan trọng trong quá trình tiêu hóa mỡ.

Trong chăn nuôi lợn, Aflatoxin ảnh hưởng đến sự phát dục và đặc biệt có thể gây sẩy thai ở lợn nái có chửa. Lợn con theo mẹ có thể nhiễm Aflatoxin qua sữa mẹ và có thể dẫn tới chết hay chậm lớn.

Ở bò sữa, Aflatoxin có thể bị phân giải và đào thải qua sữa dạng đồng phân là Aflatoxin M₁, là chất độc nguy hiểm cho trẻ em.

Đối với gia cầm sinh sản, Aflatoxin ảnh hưởng đến năng suất trứng và tỷ lệ trứng có phôi và ấp nở. Do Aflatoxin có thể kết hợp với ADN trong phôi, đã làm cho nhiều phôi bị chết ở ngày thứ 7 sau khi ấp. Trứng gà thương phẩm không chỉ nhạt

màu mà còn nhỏ hơn bình thường và dễ vỡ do lớp vỏ bị mỏng đi. Số lượng tinh dịch và tinh trùng của gà trống giảm sút rõ rệt đặc biệt ở gà Leghorn.

Nét đặc trưng nữa trong nhiễm độc Aflatoxin ở vật nuôi là sự suy giảm tính đề kháng của cơ thể với mầm bệnh. Người ta đã chứng minh rằng nếu vật nuôi bị nhiễm độc Aflatoxin thì tính kháng với bệnh giảm sút rất lớn, đặc biệt bệnh cầu trùng (Coccidiosis), bệnh đơn bào (protozoa), Salmonellosis cũng như các bệnh truyền nhiễm do siêu vi trùng như bệnh Gumboro, bệnh Newcastle; bệnh giun sán như bệnh sán lá gan, bệnh do nấm men Candida. Lý do là Aflatoxin gây ức chế quá trình miễn dịch tiếp thu, do đó làm giảm hiệu lực của các vacxin phòng bệnh, tác động này như thế nào sẽ được nghiên cứu trên các đối tượng vật nuôi.

3.5.1. Nhiễm độc Aflatoxin ở gia cầm

a) Bệnh nhiễm độc Aflatoxin ở vịt

Vịt là vật nuôi mẫn cảm nhất với Aflatoxin có trong thức ăn. Liều gây chết 50% động vật (LD_{50}) ở vịt là 0,3 mg/kg. nhiều vụ dịch gây chết vịt được thông báo. Ở Anh, 2 ổ dịch gây chết vịt là do trong thức ăn có chứa bột lạc nhập từ Braxin (Carnaghan, 1961). Bệnh cũng được phát hiện thấy ở các đàn vịt nuôi ở Kênia, ăn thức ăn được bổ sung bột lạc từ Đông Phi, ở bang Kerala Ấn Độ (Sivadas, 1968). Nhiễm độc Aflatoxin của vịt cũng được phát hiện ở Việt Nam (Đậu Ngọc Hào, 1992; Lê Thanh Liêm, 1995...).

Vịt bị nhiễm độc thường bỏ ăn, chậm phát triển, tiếng kêu không bình thường, da chân và da đùi biến thành màu tím, rối loạn vận động, co giật, ưỡn lưng, có thể dẫn đến chết.

Các biến đổi cơ quan nội tạng cho thấy: cơ thể bị phù nề; gan xuất huyết, sưng to, rắn, mật sưng, thận sưng và xuất huyết; tá tràng sưng và chứa dịch rỉ viêm. Trong trường hợp cấp tính gan sưng to, màu vàng nhạt, vàng đất thó hay màu xám nhạt. Trong trường hợp mãn tính, gan co lại, rắn chắc và xuất hiện các hạt, túi mật sưng to, chảy máu ở lách, thận và dưới da.

Các biến đổi vi thể điển hình là thoái hóa nguyên sinh chất dạng không bào, nhân tế bào bị phá hủy, ống mật dân ra, xuất hiện các sợi viêm, chảy máu lan tràn thành từng đám. Biểu mô ống thận cũng bị tổn thương, thoái hoá tế bào ống lượn, cầu thận teo, làm mất khả năng bài tiết

b) Bệnh nhiễm độc ở gà

Về lịch sử phát triển của bệnh do Aflatoxin, người ta nói đến vụ dịch gây chết 100.000 gà Tây (Turkey Disease) ở Anh vào năm 1960 (Blount, 1961). Gà bị nhiễm bệnh bỏ ăn và chết trong thời gian 7 ngày. Nhiều nguyên nhân đã được tìm kiếm như: vi trùng, siêu vi trùng hay các chất độc kim loại nhưng đều không thuyết phục. Cuối cùng đã chiết tách được trong lạc nhập từ Braxin về làm thức ăn bổ sung cho gà Tây những chất có màu huỳnh quang xanh da trời (blue) dưới ánh sáng tia tử ngoại 365 nm bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC). Từ đó, bệnh nhiễm độc Aflatoxin trong vật nuôi liên

tiếp được công bố trên phạm vi thế giới như ở Tây Ban Nha (Carnaghan, 1962), Úc (Kohler, 1962), Hungary (Derzsy, 1962). Nhiều vụ gà bị nhiễm độc Aflatoxin được phát hiện ở Ấn Độ (Char, 1982), Aflatoxin còn gây thiệt hại rất lớn cho nền chăn nuôi gia cầm ở bang Tamil Nadu (Bhat, 1978).

Ở Việt Nam, bệnh cũng được phát hiện ở các trại chăn nuôi gia cầm giống nhập ngoại (Đậu Ngọc Hào, 1990, 1991, 1992, 1993; Lê Thanh Liêm, 1995...).

** Triệu chứng của bệnh*

Gà bỏ ăn, giảm tăng trọng, hiệu quả chuyển hoá thức ăn thấp, giảm sản lượng trứng, sự phát dục của gà mái và gà trống chậm. Tỷ lệ chết thường cao, đặc biệt phụ thuộc vào các yếu tố "Stress" như nóng, ẩm, chế độ chăm sóc nuôi dưỡng kém và các bệnh truyền nhiễm cộng phát. Mức độ nhiễm độc Aflatoxin ở gà phụ thuộc vào loài giống và lứa tuổi. Gà Tây mắc cảm nhất, sau đó là gà Lôi, gà Nhật, gà công nghiệp nhập ngoại và các giống gà nội.

Dấu hiệu quan sát thấy ở các đàn gà nhiễm độc Aflatoxin không đặc trưng cho bệnh, vì nhiều loại bệnh khác nhau cũng có những biểu hiện tương tự. Để chẩn đoán đúng bệnh, cần kết hợp các yếu tố triệu chứng, mổ khám và đặc biệt là phân tích Aflatoxin có trong thức ăn chăn nuôi.

** Bệnh tích đại thể và vi thể*

Ngộ độc Aflatoxin ở gà cũng giống như ở vịt về bệnh tích đại thể và vi thể. Ở thể cấp tính, bệnh tích chủ yếu là gan

vàng và sung. Trong các trường hợp mãn tính, gan biến thành màu xám hay vàng xám và trở nên xơ cứng.

Những xét nghiệm vi thể ở gan cho thấy các thùy gan bị tổn thương lan tràn kèm theo chảy máu, tế bào gan thoái hoá không bào, thoái hoá hạt và thoái hoá mỡ tùy theo hàm lượng Aflatoxin (bảng 3.15).

Bảng 3.15: Tổn thương gan ở gia súc, gia cầm được ăn thức ăn có chứa Aflatoxin (Wogan, 1966)

Tình trạng tổn thương	Bò	Bê	Lợn	Cừu	Vịt con	Vịt	Gà
Giãn ống mật	+	+	+	-	+	+	±
Tế bào gan sung to	+	+	+	-	+	+	-
Hoại tử cấp tính và chảy máu	-	-	+	-	+	-	-
Viêm sợi huyết mãn tính	-	+	+	-	±	+	-

Trong nhiễm độc mãn tính, tế bào gan trương to, nhân sung, xuất hiện nhiều dạng phân bào gián phân, giãn ống mật.

Liều Aflatoxin bán cấp tính cũng gây ở gà dò (Broiler) các bệnh tích chung về tổn thương gan như: gan biến thành màu vàng xám, chảy máu cục bộ, phát sinh các điểm hoại tử trắng và tăng lượng mỡ gan. Tế bào gan thoái hoá mỡ, thoái hoá không bào, nhân lồi lên, giãn ống mật và hình thành sợi huyết. Sự tăng sinh tế bào gan và tế bào ống mật nhằm khắc phục chức năng gan trong các trường hợp mãn tính, tế bào bất

màu kiềm. Trong quá trình viêm xuất hiện các bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính.

Ở gà Tây (Turkey), nhiễm độc Aflatoxin á cấp tính xuất hiện sự suy giảm các tiểu quản trong các bè gan. Sự tăng sinh tái tạo các tiểu quản xuất hiện nhiều ở các rãnh ngang và có xu hướng lan toàn tiểu thùy. Phát sinh các hạt nhỏ trong các tế bào ái toan.

** Suy giảm miễn dịch*

Nhiễm độc Aflatoxin đã có mối quan hệ chặt chẽ với sự tăng lên tính miễn cảm với các bệnh truyền nhiễm khác. Ở gà dò có sự miễn cảm với bệnh cầu trùng. Tỷ lệ gà nhiễm Salmonella cao hơn khi gà bị nhiễm độc Aflatoxin hoặc tăng miễn cảm nhiễm bệnh viêm túi Fabricius do virus (siêu vi trùng). Ở gà Tây được dùng vacxin phòng bệnh tụ huyết trùng (*Pasteurella multocida*) đã không có miễn dịch khi thử thách với chủng gây bệnh và tăng tính miễn cảm với bệnh cầu trùng gây ra bởi *Eimeria adenolides*. Sự suy giảm miễn dịch trong trường hợp nhiễm độc Aflatoxin được giải thích bằng nguyên nhân làm teo túi Fabricius, tuyến Thymus và lách. Sự hấp thụ và giải trừ sắt bị giảm ở gà dò dẫn đến thiếu máu, tổng số bạch cầu tăng lên.

** Thái trừ và tồn dư*

Trong cơ thể gia cầm chỉ tồn dư 1 lượng nhỏ nhưng nhanh chóng được thải hồi nếu như trong khẩu phần không có thêm Aflatoxin tiếp tục. Ở gà dò, chất thải trừ có nồng độ cao nhất

ở mề, gan, thận. Aflatoxin B₁ được chuyển hóa thành Aflatoxin B_{2a} và M₁ trong gan.

- Men gan NADP - Nicotinamid dinucleotit photphat - có thể phân giải Aflatoxin B₁ và B₂ thành Cytopentenol và Aflatoxicol. Aflatoxin B₁ bị đào thải qua mật và nước giải cũng như phân theo tỷ lệ 70:15:15 theo 6 đồng phân B₁, B₂, B_{2a}, M₁.

Aflatoxin B₁ và M₁ là chất thải chính, ở gà Tây với nồng độ cao nhất ở gan, thận, mề và phân. Aflatoxicol cũng là chất thải chính. Phần lớn các chất thải trừ khỏi biểu mô khi không còn nguồn Aflatoxin tiếp tục. Chất selen có thể làm giảm độc tố Aflatoxin do chúng thúc đẩy làm tăng tỷ lệ % Aflatoxin dạng liên kết.

Ở vịt có sự thay đổi công thức bạch cầu do sự biến đổi nhân của tế bào bạch cầu, sự suy giảm chức năng của các thực bào (phagocyt) và hệ võng mạc nội mô. Hoạt lực của cơ thể giảm sút ở gà dò, sự đáp ứng miễn dịch tế bào giảm cả ở gà ta và gà Tây.

Mặc dù có sự suy thoái miễn dịch do Aflatoxin nhưng những bằng chứng xác minh vẫn còn nhiều tranh cãi trên cả 2 khía cạnh giải phân tổ chức các cơ quan có liên quan đến bạch cầu và sự đáp ứng miễn dịch chức năng sản sinh.

3.5.2. Nhiễm độc Aflatoxin ở lợn

Lợn rất mẫn cảm với Aflatoxin. Trong những năm 1970-1980, tại Sông Bôi, Mường Hồng, Tô Hiệu (Sơn La) đã nổ ra

một số ổ dịch lợn bị ngộ độc Aflatoxin trong thức ăn, gây tổn thất rất lớn cho các cơ sở chăn nuôi. Ngộ bị nhiễm Aflatoxin B₁ hàm lượng >1000ppb. Lợn con và lợn nái mẫn cảm nhất và tỷ lệ chết rất cao (Nguyễn Thị Thuận, 1984).

LD₅₀ ở lợn là 0,62mg/kg trọng lượng cơ thể. Trong thức ăn, Aflatoxin hàm lượng từ 2-4ppm có thể gây bệnh cấp tính. Liều 260ppb cho ăn trong nhiều tuần lễ gây chậm lớn, giảm tăng trọng và hiệu quả chuyển hoá thức ăn. Liều 400ppb cho ăn trong nhiều tuần gây những biến đổi bệnh lý ở gan.

** Triệu chứng bệnh lý*

Dấu hiệu điển hình trong nhiễm độc Aflatoxin ở lợn rất khó phân biệt với một số bệnh truyền nhiễm khác, đặc biệt là bệnh Leptospira và hướng điều trị chủ yếu là dùng kháng sinh như Streptomycin. Dấu hiệu quan sát được là sự suy giảm trọng lượng, bỏ ăn hay ăn ít, tiêu tốn thức ăn nhiều. Nét đặc trưng là da vàng, đặc biệt vùng niêm mạc như mắt, mũi, sau tai, da đùi, bẹn v.v.. là những nơi dễ quan sát thay đổi màu sắc của da. Nguyên nhân do gan bị tổn thương, bilirubin tràn vào máu làm xuất hiện sắc tố vàng ở da. Nước tiểu ít, màu vàng và có mùi rất khét rất giống với mùi nước tiểu trong bệnh Leptospira. Nguyên nhân còn do tổn thương thận và lượng bilirubin trong nước tiểu tăng. Đôi khi cũng quan sát thấy các dấu hiệu ở phân. Phân màu xám, xám nhạt do bilirubin không được chuyển qua mật vào ruột giúp tiêu hoá. Phân có khi lẫn máu. Tổn thương đại thể phát hiện thấy chủ yếu ở gan, thận. Gan bị biến màu, trở nên xám nhạt, có trường hợp màu vàng

nhạt hay màu vàng đất thố. Trong trường hợp mãn tính, gan bị teo hay cứng lại, sần sùi do tổ chức xơ phát triển. Ở giai đoạn tiếp theo thường xuất hiện các u hạt nổi lên trên bề mặt của gan. Thận sưng to ở giai đoạn đầu, có màu vàng đất hay màu xám nhạt, sau đó trở nên xơ cứng, teo. Chức năng bài tiết bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Bệnh lý vi thể ở gan cho thấy các dạng thoái hoá và huỷ hoại tổ chức. Chảy máu ở trung tâm tiểu thùy rất điển hình.

** Biến đổi tổ chức và chức năng sinh lý, sinh hoá*

Cũng như ở gia cầm, nét đặc trưng của nhiễm độc giai đoạn đầu là gan thoái hoá mỡ. Trong tổ chức tế bào nhiễm nhiều hạt mỡ, tạo màu sắc vàng nhạt và rất dễ vỡ. Thoái hoá rất phổ biến ở các vùng trung tâm. Nhiễm độc thể mãn tính, thường xuất hiện các tế bào gan khổng lồ, nhân tế bào đột biến, phát triển dạng sợi trong nội ống và tăng sinh mô ống mật.

Các biến đổi sinh hoá trong bệnh nhiễm độc Aflatoxin cũng đã được nghiên cứu. Sự sản sinh nhiều prothrombin làm giảm thời gian đông máu. Hoạt độ các men sGOT và sGPT tăng lên do các tế bào gan bị huỷ hoại.

Protein tổng số giảm do quá trình sinh tổng hợp protein bị ảnh hưởng. Ngoài ra, các thành phần khác như tổng số sắt liên kết, albumin, globulin, cholesterol, ure máu cũng bị giảm.

Chuẩn đoán nhiễm độc Aflatoxin không thể chỉ dựa vào triệu chứng quan sát. Cần phải tìm kiếm sự có mặt của Aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi. Nếu trong khẩu phần thức

ăn có từ 500 đến 700ppb Aflatoxin, lợn con theo mẹ sẽ chậm lớn do bú sữa mẹ có Aflatoxin M₁.

Ở lợn mẹ thường xuất hiện vàng da, lông xơ. Cả lợn mẹ, lợn choai và lợn con đều rất dễ cảm nhiễm.

3.5.3. Nhiễm độc Aflatoxin ở các loài vật khác

a) Ở trâu bò

Nhiễm độc Aflatoxin ở đại gia súc thường ít gặp hơn ở gia cầm và lợn. Bò sữa do được ăn thức ăn giàu protein như bã lạc, bã khô dầu bông v.v... lượng Aflatoxin không đủ để có thể gây độc cấp tính. Tuy nhiên đối với bò sữa thì mức độ nguy hiểm của thức ăn có chứa Aflatoxin là do sự đào thải độc tố qua sữa. Aflatoxin cũng có thể bị phân huỷ một phần ở dạ cỏ do hệ vi sinh vật trong dạ cỏ rất phong phú.

Vào những năm 1960 những bê non được ăn khẩu phần có chứa 15% bột lạc nhập từ Braxin đã có những biểu hiện của nhiễm độc Aflatoxin, gan xơ và giãn ống mật. Năm 1962 một vụ nhiễm độc tương tự gây chết 4/16 bê. Triệu chứng và bệnh tích cũng giống như trường hợp trên, chủ yếu là sự phá huỷ tế bào gan và tăng sinh ống mật. Một bê già hơn được ăn khẩu phần có chứa 2000ppb Aflatoxin B₁ đã bị chết sau đó. Gần đây, 12/90 bê đã bị chết do ăn phải thức ăn có khô lạc khi phân tích chứa tới 2230ppb Aflatoxin B₁ (Mc Kenzie, 1981).

Một vụ nhiễm độc ở bê do Aflatoxin có trong thức ăn đã được phát hiện ở Tây Ban Nha (Otero, 1982), 448 bê trong số 2532 bê vỗ béo đã bị chết. Nguyên nhân do bê ăn ngô bị

nhễm nấm có chứa Aflatoxin B₁. Bột ngô đem cho vịt ăn đã gây chết 100% vịt thử nghiệm.

Mổ khám các bê bị chết quan sát thấy bệnh tích điển hình của nhiễm độc Aflatoxin: chảy máu ở túi mật, dạ dày, ruột non, ruột già, tim và gan. Keyl và Boots (1971) đã thực nghiệm bằng cách bổ sung các hàm lượng Aflatoxin thích hợp vào khẩu phần ăn của bò để xác định sự miễn cảm của chúng đối với Aflatoxin và khả năng gây chết cấp tính. 50 bê non được chia thành 5 nhóm, mỗi nhóm 10 con và được ăn khẩu phần có chứa 1000, 700, 300, 100 và 0 ppb Aflatoxin B₁.

Kết quả cho thấy ở nhóm ăn thức ăn có chứa 1000ppb đã có 2 trong 10 bê bị chết. Sau 59 và 137 ngày, gan của 3 trong 8 bê còn lại bị tổn thương, giảm chuyển hoá thức ăn. Hàm lượng Aflatoxin 700ppb không gây chết bê trong thời gian nuôi 133 ngày nhưng gây tổn thương gan 2 trong số 10 bê và giảm chuyển hoá thức ăn. Ở các nhóm thí nghiệm còn lại, gan bê không bị tổn thương nhưng có biểu hiện biếng ăn. Không phát hiện thấy độc tố tồn dư trong gan thậm chí ở hàm lượng 1000ppb. Như vậy bê non cũng là động vật miễn cảm với Aflatoxin nhưng ở mức độ trung bình và có thể chịu đựng được đến hàm lượng 300 ppb.

Bò sữa là loại gia súc cần được bảo vệ khỏi bị nhiễm độc Aflatoxin có trong thức ăn, bởi vì Aflatoxin B₁ sẽ được đào thải qua sữa dạng đồng phân Aflatoxin M₁. Các tổ chức quốc tế và nhiều quốc gia đã đề ra những hạn chế về hàm lượng độc tố trong thức ăn của bò sữa nhằm tránh được mối nguy hiểm của Aflatoxin M₁ cho con người. Cộng đồng Châu Âu

(EEC) chỉ cho phép giới hạn tối đa của Aflatoxin B₁ trong thức ăn cho bò sữa là 10ppb.

Nghiên cứu khả năng thải qua sữa của Aflatoxin B₁ cho thấy có tới 3,3% Aflatoxin B₁ được thải qua đường này ở dạng Aflatoxin M₁ (Keyl, 1978). Bò sữa cũng mẫn cảm với Aflatoxin, nếu trong khẩu phần ăn có 500ppb Aflatoxin B₁ đã gây chậm phát triển và giảm chuyển hoá thức ăn.

b) Ở cừu

Chưa thấy có công bố về nhiễm độc Aflatoxin ở cừu. Lý do có thể do cừu chỉ được ăn cỏ nên ít có cơ hội bị nhiễm Aflatoxin vì độc tố này không có trên đồng, trừ những trường hợp cừu được ăn thêm khẩu phần vỗ béo có chứa bột vào mùa đông.

c) Ở thỏ

Trường hợp thỏ bị nhiễm độc Aflatoxin cũng đã được ghi nhận (Ferban, 1981). Thỏ là loài vật rất mẫn cảm với Aflatoxin. LD₅₀ là khoảng 0,3mg/kg thể trọng, tương đương với liều gây chết vệt. Morisse (1981) đã thử nghiệm gây bệnh Aflatoxin ở thỏ và cho biết, nếu trong khẩu phần ăn của thỏ chứa 330ppb Aflatoxin B₁, thỏ bị chết sau 3 tuần thí nghiệm, tỷ lệ chết lên tới 30%. Mổ khám bệnh tính đã xác nhận sự huỷ hoại tế bào gan.

d) Ở cá

Bệnh Aflatoxin chỉ quan sát thấy ở cá chần nuôi tại các trại cá thương phẩm. Cá hồi mẫn cảm nhất đối với Aflatoxin.

Thí nghiệm cho thấy liều LD_{50} ở cá hồi cũng tương đương với ở vịt và thỏ. Người ta cũng gây các u ung thư thực nghiệm ở các hồi. Theo Sinnhuber và Wales (1978), lượng độc tố 0,5ppb trong khẩu phần thức ăn đã làm tăng một cách có ý nghĩa các trường hợp u ung thư ở loài *Mt. Mhastra*. Hàm lượng 20ppb Aflatoxin B_1 trong thức ăn hàng ngày có thể gây chết, 36% trường hợp có u ung thư gan sau 12 tháng. Aflatoxin G_1 cùng hàm lượng trên chỉ có thể gây cho loài này 17% trường hợp u ung thư gan sau 16 tháng thử nghiệm. Tuy nhiên các loài cá hồi khác nhau cũng mẫn cảm khác nhau với Aflatoxin B_1 . Riêng loài cá hồi *Salmo aguabonita* là hoàn toàn kháng lại với Aflatoxin B_1 . Đã có nhiều vụ nhiễm độc Aflatoxin "trong nước". Vào năm 1960, nhiều trường hợp nhiễm độc ở cá được phát hiện tại Mỹ. Bệnh nhiễm độc kiểu này là do thức ăn của cá chứa bột hạt bông bị nhiễm Aflatoxin.

Những vụ chết cá tương tự đã được nói đến trong các tài liệu từ những năm 1936. Vì vậy, để tránh thiệt hại có thể nuôi những giống kháng với Aflatoxin hoặc cần chú ý tới khẩu phần ăn của chúng.

3.6. ẢNH HƯỞNG CỦA AFLATOXIN ĐẾN CÁC CHỈ SỐ SINH LÝ, SINH HOÁ VÀ SỰ TỒN DƯ ĐỘC TỐ TRONG MÔ BÀO

3.6.1. Ảnh hưởng của Aflatoxin B_1 đến các chỉ số sinh lý và sinh hoá

Trong chăn nuôi công nghiệp người ta luôn chú ý tới màu sắc của thịt và trứng, đặc biệt là màu vàng của da và màu đỏ

của lòng đỏ trứng. Các nhà sản xuất đã sử dụng các chất tạo màu có chứa sắc tố (như caroten) để tạo ra các sản phẩm có màu hấp dẫn bằng cách đưa chúng vào thức ăn.

Nếu trong khẩu phần ăn có chứa Aflatoxin B₁ sẽ gây ra sự giảm sút các sắc tố đó, đặc biệt ở gà dò. Phương thức tác động của Aflatoxin tới quá trình trên rất phức tạp song có thể thấy Aflatoxin đã ức chế quá trình chuyển hoá và làm mất các sắc tố màu ngay trong niêm mạc đường tiêu hoá, trong huyết thanh và trong gan hơn là làm mất chúng ở da. Ảnh hưởng này còn nghiêm trọng hơn khi trong khẩu phần ăn nghèo chất dinh dưỡng như protein, lipid, axit tanic, hoặc thiếu vitamin D₃ và Riboflavin. Sự cân bằng men tuyến tụy bị ảnh hưởng làm giảm men tiêu hoá tinh bột Amilaza và Lipaza, do đó trong các trường hợp nhiễm độc Aflatoxin trong phân có nhiều mỡ (Steatorrhea).

Nhiễm độc Aflatoxin gây giảm lượng hồng cầu, thiếu máu và giảm thể tích các tế bào hữu hình, giảm tổng số hemoglobin. Thể tích các tiểu cầu giảm nhưng hàm lượng hemoglobin tiểu cầu không giảm. Ảnh hưởng của Aflatoxin còn thể hiện qua sự giảm hàm lượng protein toàn phần, tăng số bạch cầu và tăng hoạt lực men gan chủ yếu là sGOT.

Nghiên cứu của Chu Văn Thanh (1997) trên vịt con 1 ngày tuổi. Lê Thị Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Nam (1998) trên gà 1-49 ngày tuổi nhiễm độc Aflatoxin đều cho thấy sự suy giảm các thành phần hữu hình trong máu, nhất là hồng cầu và protein toàn phần. Mức độ suy giảm đặc biệt nghiêm

trọng ở vịt được ăn khẩu phần có chứa 1000ppb Aflatoxin B, (bảng 3.16 - 3.17).

Bảng 3.16: Ảnh hưởng của Aflatoxin B, đối với một số thành phần huyết học ở vịt con (super meat) 12 ngày tuổi
(Luận văn Tiến sĩ Khoa học của Chu Văn Thanh, 1997)

Thành phần máu	Hàm lượng Aflatoxin trong thức ăn (ppb)					
	0	10	26	39	78	180
Hồng cầu (triệu/mm ³)	3,7 ± 0,2	3,66 ± 0,11	3,78 ± 0,15	3,14 ± 0,28	3,94 ± 0,26	2,8 ± 0,41
Bạch cầu (nghìn/mm ³)	18,4 ± 0,13	18,24 ± 2,78	20 ± 1,12	16,48 ± 2,18	21,4 ± 0,78	23,6 ± 0,15
Hàm lượng huyết sắc tố (Hb) (mg%)	13,56 ± 0,5	12,62 ± 0,18	11,74 ± 0,1	12,16 ± 0,13	7,96 ± 0,52	6,88 ± 0,61
Lâm ba cầu (%)	49,12	46,56	47,6	41	42,4	40
Men gan sGOT (U/l/h)	26,4 ± 7,98	28,6 ± 6,45	20,6 ± 3,1	61,2 ± 14,11	123 ± 53,94	180,4 ± 76,6
Men gan sGPT (U/l/h)	6,18 ± 0,09	3,62 ± 0,53	5,34 ± 0,76	7,2 ± 1,68	5,84 ± 0,83	6,3 ± 2,8
Protein toàn phần (g%)	3,28 ± 0,13	3,79 ± 0,2	3,72 ± 0,07	2,16 ± 0,1	1,55 ± 0,2	0,88 ± 0,1
Albumin (g%)	1,7 ± 0,12	1,66 ± 0,09	1,59 ± 0,12	0,97 ± 0,07	0,7 ± 0,07	0,47 ± 0,04
Globulin (g%)	1,95 ± 0,15	2,11 ± 0,18	2,07 ± 0,43	1,13 ± 0,1	0,84 ± 0,13	0,71 ± 0,08

Mặc dù ở gà, sự mẫn cảm với Aflatoxin ở gà thấp hơn ở vịt, song theo nghiên cứu của tác giả Lê Thị Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Nam, hàm lượng 200ppb và 500ppb Aflatoxin B₁ trong khẩu phần thức ăn đã gây nhiều biến đổi về các chỉ tiêu huyết học ở gà bị nhiễm độc.

Bảng 3.17: Biến đổi thành phần huyết học ở gà thí nghiệm nuôi từ 1 - 28 ngày tuổi
(Lê Thị Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Nam, 1998)

Chi tiêu \ Lô thí nghiệm(ppb AF)	I (0)	II (200)	III (500)
Hàm lượng đường huyết (mg%)	165,8	130	123
Protein toàn phần (g%)	3,58	2,78	1,83
Men sGOT (U/l)	135	194	198
Men sGPT (U/l)	6,0	8,34	9,0
Tỷ số A/G	1,02	0,74	0,62
Lâm ba cầu (%)	52,47	50,38	40,5

Sự thay đổi được chú ý đặc biệt bởi sự giảm sút số lượng protein toàn phần và tỷ số A/G.

Ở các thí nghiệm khác cũng cho thấy những kết quả gần giống với các thí nghiệm của các tác giả trong nước.

3.6.2. Tồn dư Aflatoxin trong mô bào

Ở gà đẻ, nếu trong khẩu phần có chứa Aflatoxin, sau 72 giờ phần lớn chất độc và chất phân giải được thải qua mật và phân. Người ta đã phát hiện được Aflatoxin tồn dư trong gan,

thận, cơ và trứng. Ở gà mái đẻ, sau 7 ngày ăn khẩu phần thức ăn có Aflatoxin B₁ có thể tìm thấy độc tố trong trứng. Aflatoxin có thể phân tán nhanh chóng trong biểu mô. Cả Aflatoxin B₁ và Aflatoxicol có thể còn tồn tại sau 7 ngày từ khi loại bỏ thức ăn có chứa Aflatoxin.

Nghiên cứu của nhiều tác giả cho thấy, sự tồn dư của Aflatoxin trong cơ, trong gan, thận đã được xác định. Tuy phân tích của tác giả còn có nhiều điểm khác nhau, song đều cho thấy có sự tồn dư và nó phụ thuộc vào hàm lượng Aflatoxin súc vật bị nhiễm (bảng 3.18).

Bảng 3.18: Tồn dư Aflatoxin B₁ trong mô bào vật nuôi
(Johanna Fink - Gremmels, 1989, Tài liệu tổng hợp)

Vật nuôi	Hàm lượng Aflatoxin trong thức ăn	Chất tồn dư	Tồn dư (ppb)		
			Gan	Thận	Cơ
Lợn	Aflatoxin B ₁				
	100-400ppb	AfB ₁ AfM ₁	0,3-2,7 0,2-2,0	0,3 0,1-0,2	0,2 0,04-0,4
	250-417ppb	AfB ₁ AfM ₁	51-92 3-4	10-50 3-6	
	4000ppb	AfB ₁ AfM ₁	6,0 3,0	0,2 1,0	0,1 0,05
	662ppb	AfB ₁	0,07	0,27	0,07
	273ppb AfB ₂				
	Aflatoxin B ₁ bị nhiễm trong thức ăn tự nhiên	AfB ₁ AfB ₁ AfM ₁ Aflatoxicol	0,1 0,15-0,26 0,51-1,7 0,1-0,2	0,6 1,1-2,6 KXĐ	0,4 KXĐ KXĐ

Vật nuôi	Hàm lượng Aflatoxin trong thức ăn	Chất tồn dư	Tồn dư (ppb)		
			Gan	Thận	Cơ
Bò	Aflatoxin B ₁ bị nhiễm trong thức ăn tự nhiên				
	1050ppb	AfB ₁ AfM ₁	5 5	1-2 KXĐ	1-2 KXĐ
	693ppb	AfB ₁ AfM ₁	0,05 0,1	KXĐ 0,2	KXĐ KXĐ
Cừu	Aflatoxin B ₁ 360 mg/kg TL	AfB ₁	+	+	+
Gia cầm	Aflatoxin B ₁				
	280-1600ppb	AfB ₁			1
	4300ppb	AfB ₁			2
	100ppb	AfB ₁			0,35
	1000ppb				3,7
	5000ppb				18,35
	15000				21-24
Trứng	Aflatoxin B ₁		trong trứng		
	100ppb	AfB ₁	0,23		
	400ppb	AfB ₁	1,4		
	13ppb	AfB ₁	0,05		
	84ppb	AfB ₁	0,33		
	5000ppb	AfB ₁	0,09		
	100ppb	AfB ₁	0,09		
	8000ppb	AfB ₁	1,99		

Số liệu này của nhiều tác giả khác nhau như: Jacobson (1974), Petterson (1984), Hald (1973), Kabilka (1986), Kuiper - Goodman (1987), Leihetseder (1985), Truckness (1985), Wolzak (1985), Yonova (1985) .v.v.

Chương IV

PHÒNG CHỐNG NẤM MỐC VÀ ĐỘC TỔ NẤM MỐC

4.1. PHƯƠNG PHÁP PHÒNG CHỐNG NẤM MỐC

Phòng chống sự phát triển của nấm mốc nói chung và nấm mốc sinh Aflatoxin nói riêng là biện pháp quan trọng nhất nhằm ngăn chặn sự giảm giá trị dinh dưỡng của thức ăn đồng thời ngăn chặn sự phát triển của độc tố.

Có nhiều phương pháp phòng chống nấm mốc:

1. Phương pháp phơi sấy để làm khô.
2. Phương pháp dùng hoá chất để ức chế sự phát triển của nấm mốc.
3. Phương pháp sinh học.

4.1.1. Phương pháp làm khô tự nhiên

Đây là phương pháp được áp dụng lâu đời trong quá trình bảo quản hạt.

Hạt ngũ cốc sau thu hoạch thường có độ ẩm rất cao, ví dụ ngô có thể từ 35-45%. Do đó phải tìm cách giảm độ ẩm của hạt xuống mức tối đa để cất giữ. Con đường đơn giản nhất là phơi khô, lợi dụng năng lượng ánh sáng mặt trời. Nếu ngô hạt đạt được độ ẩm < 13% trước khi bảo quản sẽ là lý tưởng, vì

ở đó nấm mốc không tìm thấy điều kiện phù hợp để phát triển. Ở nhiều nơi do điều kiện thu hoạch không thuận lợi cho việc sử dụng năng lượng mặt trời, người ta dùng phương pháp sấy nhân tạo. Tuy nhiên cả phương pháp sấy nhân tạo và sử dụng nguồn năng lượng mặt trời đều tồn tại những nhược điểm sau:

- Trong vụ thu hoạch đôi khi không có ánh sáng mặt trời hoặc trời mưa nhiều ngày làm cho việc phơi hạt gặp khó khăn.

- Sấy nhân tạo chỉ phù hợp với số lượng lớn hay sản xuất tập trung, không hoặc ít phù hợp với sản xuất nhỏ cá thể.

4.1.2. Phương pháp sử dụng hoá chất

Người ta đã sử dụng nhiều hoá chất ít độc hại hoặc vô độc để ức chế sự phát triển của nấm mốc. Các loại axit và muối của chúng như sorbat, propionat và benzoat từ lâu đã được sử dụng trong thương mại. Ngoài ra, đã sử dụng một số các chất tách từ thảo mộc, các kháng sinh tổng hợp như Natamycin có thể ức chế sự phát triển của nấm mốc ở các nồng độ thấp.

Hiện nay trên thị trường có bán nhiều loại chế phẩm chống mốc cho hạt, đặc biệt cho các nguyên liệu làm thức ăn của gia súc:

- Myco-block của hãng BIAKON. N.V/Belgium
- Mold-NilTM-Dry của hãng Nutri-ad International BVBA.
- Mold-Zap của Alltech, inc.

Các chế phẩm này được phối chế có các axit hữu cơ trong thành phần của chúng, chủ yếu là canxi propionat, sorbat và axit citric.

Một số các loại hương liệu và gia vị cũng được sử dụng trong bảo quản chống mốc như cây đinh hương, cây quế, mù tạc, hạt tiêu, tỏi, tinh dầu cam, chanh, chất chống oxy hoá v.v...

a) Axit sorbic

Axit sorbic và muối sorbat đã được phép sử dụng rộng rãi trong bảo quản thực phẩm chống nấm mốc. Axit sorbic có sẵn trong tự nhiên, đặc biệt trong cây Askberries, cũng có thể được tổng hợp hoá học. Nhược điểm của axit sorbic là tính hoà tan kém, vì vậy dạng muối kali được sử dụng nhiều hơn do hoà tan tốt. Axit sorbic chỉ hoà tan được 0,15% trong nước, còn kali sorbat hoà tan tới 58,2%. Nhưng tác dụng chống nấm mốc của các muối sorbat kém hơn axit sorbic. Vì vậy, thông thường axit sorbic và muối kali sorbat được phối hợp với những tỷ lệ thích hợp để chống nấm mốc trong bảo quản.

Bandelin (1958) đã nghiên cứu khả năng ức chế nấm mốc của axit sorbic và nhận thấy nồng độ tối thiểu ức chế là 0,02% đối với *Alternaria solani* và 0,08% đối với *Penicillium citrinum* và *Aspergillus niger*. Nồng độ này thấp hơn nhiều so với axit benzoic và axit propionat (bảng 4.1).

Bảng 4.1: Nồng độ axit tối thiểu ức chế một số loài nấm mốc (Bandelin, 1958)

Hợp chất	Nồng độ ức chế tối thiểu của các loại nấm (%)		
	<i>Alternaria solani</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Axit benzoic	0,15	0,2	0,2
Axit propionic	0,06	0,08	0,08
Axit sorbic	0,02	0,08	0,08

Người ta đã thí nghiệm khả năng của axit sorbic và muối sorbat chống nấm mốc, đặc biệt là các loại nấm sản sinh độc tố như *Aspergillus*, *Penicillium* v.v... Udagawa và cộng sự (1977) nghiên cứu tác dụng chống nấm mốc của kali sorbat trên 5 mức khác nhau được nhiễm 3 loại nấm là: *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* và *Rhizopus stolonifer*. Lượng kali sorbat được đưa vào thí nghiệm là 0,01; 0,025 và 0,05%. 4 trong 5 loại đã không có nấm mọc trong suốt thời gian thí nghiệm ở nồng độ 0,01-0,025%. Thử nghiệm với *Aspergillus flavus* (loài nấm sản sinh Aflatoxin) cho thấy, kali sorbat ở nồng độ 0,05% (50 ppm) chỉ ức chế được 2% sự phát triển của nấm và 10% khả năng sinh Aflatoxin, hàm lượng 0,25% (250 ppm) ức chế 10% nấm phát triển và giảm khả năng sản sinh Aflatoxin tới 46%. Cũng ở nồng độ này (250 ppm), ức chế tới 20% *Penicillium cyclopium*.

Masimango (1979) đã nghiên cứu tác động của một số loại hoá chất chống nấm *Aspergillus flavus* và nhận thấy axit sorbic và kali sorbat nồng độ 1% đã ức chế được hơn 50%, còn hàm lượng 0,1% chỉ làm giảm chút ít sự sản sinh Aflatoxin (bảng 4.2). Bullesman (1979) cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của potassium sorbat đối với nấm *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium commune* và *P. patulum* trong môi trường lỏng. Lượng muối sorbat sử dụng là 0,05; 0,1 và 0,15%. Kết quả cho thấy *A. parasiticus* bị ức chế phát triển mạnh hơn 2 loài nấm kia. Nồng độ 0,05% sorbat đã kéo dài thời gian ức chế *A. parasiticus* gấp đôi so với đối chứng.

Bảng 4.2: Ảnh hưởng của một số hoá chất chống mốc ngăn cản sự phát triển và sản sinh Aflatoxin (Masimango và cộng sự, 1979)

Hoà chất	Nồng độ sử dụng và khả năng ức chế (%)		
	1%	0,5%	0,1%
Kali sorbat	96,5	58,5	6,5
Axit sorbic	97,1	57,8	10,2
Canxi propionat	33,1	—	—
Canxi propionat	52,3	49,2	—
Natri benzoat	23,2	—	—
Axit benzoic	23,6	—	—

Ở nồng độ 0,1% thời gian ức chế kéo dài gấp 3 lần so với đối chứng. Ở nồng độ 0,15% ức chế hoàn toàn sự phát triển của *A. parasiticus*. Cũng theo thông báo của Bullerman, cả 3 loại nấm mốc được thử nghiệm trên đã không có khả năng sản sinh độc tố trong môi trường nuôi cấy.

b) Axit propionic

Axit propionic cũng được sử dụng rất rộng rãi trong bảo quản thực phẩm và thức ăn gia súc để chống mốc. Thường dùng dạng muối như natri propionat hay canxi propionat. Axit propionic là một chất lỏng giống như dầu, có vị chua hơi cay và có mùi khó chịu, có thể hoà tan trong nước và các dung môi hữu cơ như rượu, etc, cloroform.

Tác dụng chống mốc của axit propionic và các muối của nó đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy dạng natri propionat và axit propionic có tác dụng tốt hơn canxi propionat. Canxi propionat ở hàm lượng 0,5 và 1% chỉ bảo vệ được mẫu khỏi mốc trong phạm vi 1 tuần, trong khi đó natri propionat và axit propionic nếu cùng nồng độ có thể bảo vệ mẫu khỏi mốc trong 17 tuần. Bandelin (1958) nhận thấy ở nồng độ 0,06 và 0,08%, trong môi trường có pH = 5,0 axit propionic có tác dụng ức chế nhiều loài nấm mốc bao gồm nhóm *Aspergillus*. Gosloromoki sử dụng axit propionic ở nồng độ 0,3% giữ được hạt mạch có hàm lượng nước 18% và 23% khỏi bị hư hỏng trong thời gian 5 tháng. Hàm lượng axit

0,1% có thể kìm hãm sự nảy mầm của bào tử nấm mốc. Nhưng nghiên cứu khác lại cho thấy, nếu sử dụng axit propionic ở nồng độ 0,8% có thể chống mốc cho hạt có hàm lượng nước tới 20%. Trong các mẫu thí nghiệm với các hàm lượng trên đây đã không thấy *Aspergillus flavus* và độc tố Aflatoxin.

Vandegraft (1975) đã thí nghiệm sử dụng 1% axit propionic bảo quản ngô bị nhiễm *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Penicillium viridicatum* và nhận thấy đã ức chế hoàn toàn 4 loại nấm trên và sự sản sinh độc tố của chúng trong thời gian 29 tuần. Trong khi đó ở mẫu đối chứng, *A. ochraceus* và *A. parasiticus* phát triển rất mạnh.

Theo Stewart (1977), axit propionic. Ở nồng độ 3-4 mg/ml đã ức chế sự phát triển của nấm và sự sản sinh bào tử trong môi trường lỏng (bảng 4.3). Tuy nhiên ở nồng độ 3 mg/ml, bào tử nấm mốc vẫn còn có thể phát triển được. Masimango nghiên cứu ảnh hưởng của canxi propionat đến khả năng sản sinh Aflatoxin của *A. parasiticus*. Họ nhận thấy, axit propionic 0,5% và 1% đã làm giảm 52,3% và 49,2% Aflatoxin, nồng độ 0,1% không ức chế được sự sản sinh độc tố trong môi trường nuôi cấy. Canxi propionat 1% chỉ hạn chế được 33,1% lượng Aflatoxin sản sinh ra, còn hàm lượng 0,5% và 0,1% không có tác dụng.

Bảng 4.3: Ảnh hưởng của axit propionic đến sự phát triển và sản sinh Aflatoxin của *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 trong môi trường lỏng ở 28°C và pH = 4,5 (Stewart, 1977)

Axit propionic (mg/ml)	Trọng lượng khô của hệ sợi nấm (mg)			
	0 ngày	2 ngày	6 ngày	10 ngày
0	0	776	1573	1007
1	0	336	1562	1005
2	0	0	1341	1337
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0

Mặc dù axit propionic và các muối của nó có tác dụng rất tốt để phòng chống sự phát triển của nấm mốc và sự sản sinh các độc tố, nhưng trong công nghiệp thực phẩm cũng ít được sử dụng, chủ yếu trong công nghiệp sản xuất bánh mì. Ngày nay, các chất này được dùng nhiều trong bảo quản thức ăn chăn nuôi, đặc biệt là các loại hạt, dưới dạng kết hợp giữa các muối của axit propionic và các muối của của axit sorbic, axit citric v.v...

c) Axit benzoic

Axit benzoic là chất thông dụng trong công nghiệp thực phẩm để phòng chống nấm mốc, tồn tại dưới dạng tự do và dạng kết hợp như muối natri benzoat. Tác dụng kháng nấm

của axit benzoic chủ yếu trong môi trường axit, ít có tác dụng trong môi trường trung tính.

Axit benzoic đã được thử nghiệm để xác định nồng độ kháng nấm từ 0,05-0,1%. Theo Badelin, nồng độ muối benzoat cần thiết để ngăn chặn nấm mốc phát triển là 0,15% với *Alternaria solani* 0,2% với *Penicillium citrinum* và *Aspergillus niger*. Uraih (1977) nhận thấy khả năng sản sinh Aflatoxin của *Aspergillus flavus* bị giảm xuống đáng kể khi có mặt của axit benzoic và natri benzoat. Sự giảm hàm lượng Aflatoxin tương ứng với sự có mặt của hàm lượng benzoat. Ở nồng độ 0,8% (8 mg/ml), axit benzoic và natri benzoat không ngăn cản được sự sản sinh Aflatoxin. Các tác giả cũng đều ghi nhận sự giảm và làm chậm quá trình hình thành bào tử của *Aspergillus flavus* với sự có mặt của axit benzoic và natri benzoat.

Ảnh hưởng axit benzoic và natri benzoat đối với sự hình thành Aflatoxin trong môi trường nuôi cấy Aspergillus flavus (mg/25ml môi trường)

Masimango cũng đã nghiên cứu tác dụng của axit benzoic với khả năng hình thành Aflatoxin và nhận thấy, axit benzoic và natri benzoat nồng độ 1% đã ức chế được 23,6% nấm mốc và 23,2% sự sản sinh Aflatoxin. Ở hàm lượng 0,5 và 0,1% không có sự ức chế nấm mốc sản sinh độc tố.

Gần đây Chipley và Uraih (1980) đã tìm hiểu ảnh hưởng của một số hàm lượng axit benzoic đến sự sản sinh Aflatoxin

của 2 loài nấm *Aspergillus flavus* và *A. parasitius*. Họ cho biết, hàm lượng 2,5mg (0,01%) của O-nitrobenzoat hoặc P-aminobenzoat trong 25ml môi trường đã thúc đẩy sự phát triển của *Aspergillus flavus* nhưng làm giảm sự hình thành Aflatoxin. Cũng ở nồng độ như vậy thì ethyl aminobenzoat hạn chế sự phát triển của *Aspergillus flavus* nhưng lại thúc đẩy sinh tổng hợp Aflatoxin.

Ở liều 5mg (0,02%) ethyl benzoat trong 25ml môi trường nuôi cấy đã làm giảm sự phát triển của *Aspergillus flavus* và ngăn cản hoàn toàn sự sản sinh Aflatoxin.

d) Một số kháng sinh

Natamycin (Pimaricin)

Natamycin có tác dụng ức chế nấm mốc, không có tác dụng đối với vi khuẩn. Natamycin không được phép dùng chống nấm mốc trong thực phẩm ở Mỹ song lại được các nước ở châu Âu sử dụng. Thuốc có thể ức chế nhiều loại nấm mốc ở hàm lượng rất thấp. Shahani thông báo, ở nồng độ 0,05% (50 ppm) bảo quản chống mốc cho hạt được từ 1 đến 5 ngày. Ở nồng độ thấp 1 ppm Natamycin có thể ức chế nhiều loại *Penicillium*. Tuy nhiên, phải tới nồng độ 100 ppm mới ngăn cản được sự phát triển của *Aspergillus flavus* (Ticha, 1975).

Thí nghiệm của Shahani cho thấy ở hàm lượng Natamycin thấp hơn đã ức chế được sự phát triển và sản sinh độc tố của *Aspergillus flavus* và *A. ochraceus* (bảng 4.4)

Bảng 4.4: Tác dụng ức chế sự phát triển và sản sinh độc tố của Natamycin đối với *Aspergillus flavus* NRRL 3000 và *A. ochraceus* NRRL 3174
(Shahani, 1973, Shahani và Goldberg, 1972)

Hàm lượng Natamycin	Aspergillus flavus (% ức chế)		A. ochraceus (% ức chế)	
	Phát hiện	Sinh độc tố	Phát hiện	Sinh độc tố
0	0	0	0	0
1	0,3	25,0	16,0	93,2
10	37,8	62,0	46,0	100,0
50	71,4	99,0	52,2	100,0

Nghiên cứu của nhiều tác giả khác cũng cho thấy Natamycin có thể ngăn cản sự hình thành các độc tố của nấm *Penicillium* trên môi trường nuôi cấy nhân tạo. Tác dụng ức chế sự sản sinh độc tố của thuốc mạnh hơn so với ức chế phát triển của nấm mốc.

Về ảnh hưởng của Natamycin đối với nấm mốc mọc trên nhiều loại format khác nhau, Shahani cho biết nồng độ 0,05-5 ppm làm giảm sự hình thành bào tử của *Aspergillus parasiticus* và *Penicillium patulum*. Khi format được nhúng vào dung dịch 0,1-0,2% Natamycin, nhiều loài nấm mốc đã không phát triển được. Aflatoxin không được sản sinh ra hoặc ở hàm lượng rất thấp không đủ để phát hiện.

Một số loại kháng sinh khác như Bongkrekie axit và Nisin cũng có tác dụng chống nấm mốc. Bongkrekie axit được tách từ môi trường nuôi cấy *Pseudomonas coccovenus*.

Nisin ở hàm lượng 5 và 125 ppm đã ức chế sự phát triển của *A. parasiticus*.

e) Thảo mộc và gia vị

Rất nhiều loài thảo mộc có tác dụng chống nấm mốc. Theo công bố của Buchaman, cây quế (Cinamon) có tác dụng ngăn cản sự phát triển của nấm mốc *Alternaria*, *Penicillium* và *Aspergillus*. Hạt tiêu, hành và đinh hương cũng có tính kháng nấm nhưng yếu hơn.

Bullerman (1979) phát hiện thấy sự sản sinh Aflatoxin của nấm *Aspergillus parasiticus* trong nhiều loại bánh mì khác nhau như mì đen, trắng. Tuy nhiên đã tìm thấy rất ít hoặc hầu như không có trong bánh mì màu nho có chứa quế. Kết quả phân tích Aflatoxin cho thấy ở các loại bánh mì đều có chứa Aflatoxin trừ bánh mì màu nho. Ở hàm lượng quế 0,02% đã gây ức chế phát triển của nấm mốc tới 31% và sự sản sinh Aflatoxin giảm từ 25-97% trên môi trường nhân tạo.

Bảng 4.5: Ảnh hưởng của quế đến sự phát triển và sản sinh Aflatoxin của *A. Parasiticus* NRRL 2999 trong môi trường Yeast sau 10 ngày ở 25°C

Hàm lượng quế (%)	Tỷ lệ ức chế (%)	
	Sự phát triển	Sự sản sinh Aflatoxin
0	0	0
0,02	16	25
0,2	23	57
2	31	97
20	100	100

Monozumi nghiên cứu thành phần hoạt chất của cây quế đã cho biết methyloxynamaldehyde hàm lượng 100 mg/ml có tác dụng ức chế hoàn toàn sự phát triển của *A. parasiticus* và *A. flavus*. Liều 200 mg/ml hoạt chất trên ức chế sự phát triển của *A. ochraceus* và *A. versicolor*, nếu sử dụng liều 624 mg/ml có thể ức chế tới 90% Aflatoxin B₁ được sản sinh ra (bảng 4.5).

Khi nghiên cứu ảnh hưởng của 13 loại hợp chất từ thảo mộc và 7 đồ gia vị khô được bán trên thị trường hạn chế sự phát triển và sinh độc tố của nhiều loại nấm *Aspergillus*, Hitokoto (1980) cũng nhận thấy quế có tác dụng nhất. Tỏi, đinh hương, hạt tiêu Jamaica ức chế hoàn toàn sự phát triển của nhiều loại nấm mốc, nhưng nhiều loại gia vị và thảo mộc khác chỉ ức chế được sự sản sinh Aflatoxin. Thymol chiết tách từ cỏ xạ hương, eugenol từ đinh hương ở nồng độ < 0,4 mg/ml có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của *Aspergillus flavus* và *A. versicolor*. Liều 2 mg/ml methanol chiết tách từ hạt anis cũng có tác dụng như vậy đối với các chủng nấm mốc thử nghiệm. Buchanan cũng công bố ở hàm lượng 500 mg/ml thymol ức chế hoàn toàn sự phát triển của *A. parasiticus*.

Nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy cây gia vị thường có tác dụng nhiều đến ức chế sự hình thành Aflatoxin hơn là ức chế sự phát triển của hệ sợi. Nồng độ $\geq 5\%$ đinh hương đã ức chế hoàn toàn sự phát triển và sản sinh Aflatoxin. Nồng độ $\geq 5\%$ bạc hà, thì là Ai Cập và 10% của hạt tiêu bắc đen đã ngăn chặn được sự sản sinh Aflatoxin.

f) Tinh dầu

Một số loại tinh dầu có tính kháng nấm. Nồng độ 0,2% tinh dầu cam có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của *A. flavus*. Tinh dầu chanh ở hàm lượng 0,3-0,35% đã làm cho nấm *A. flavus* chậm phát triển và giảm sản sinh Aflatoxin. Các tinh dầu khác như *Mentha arvenis* và *Mentha piperita* cũng có tác dụng chống nấm mốc rất tốt, đặc biệt là nấm sản sinh độc tố.

g) Các hoá chất bảo vệ thực vật

Dichlorvos là thuốc bảo vệ thực vật nhóm photpho hữu cơ. Ở hàm lượng rất thấp Dichlorvos đã có tác dụng ức chế nấm mốc. Thuốc tác động mạnh đến khả năng tạo độc tố của nấm *A. flavus* và *A. parasiticus*, nếu sử dụng 200 ppm đã ức chế tới 98% Aflatoxin sinh ra ở trong môi trường lỏng, nhưng chỉ hạn chế được 5,6% nấm mốc phát triển. Ở hàm lượng thấp hơn (10 ppm) ức chế được 2,4% nấm mốc, nhưng giảm được 96% Aflatoxin (Hsieh, 1973). Dichlorvos cũng ảnh hưởng đến sự hình thành độc tố từ các nấm khác như *Penicillium*, *Fusarium*. Cũng ở hàm lượng 20 ppm, Dichlorvos ức chế được nấm *Fusarium roseum* và *F. graminearum* sản sinh zearalenon (Rao, 1973). Để có thể tác động đến nấm *A. ochraceus* thì cần lượng Dichlorvos lớn hơn. Ở hàm lượng 100-300 ppm Dichlorvos làm giảm 11-18% nấm phát triển và giảm sinh tổng hợp 50-74% Ochratoxin. Dichlorvos còn

ức chế sự hình thành patulin và cotrin, hàm lượng 100 ppm hạn chế 50% sự phát triển của *Penicillium patulum* và giảm sự hình thành patulin tới 89%. Hàm lượng thấp Dichlorvos (1 ppm) không hạn chế được nấm nhưng lại giảm sự hình thành patulin tới 36,2%.

** Naled*

Naled cũng là đồng phân của Dichlorvos. Khi sử dụng Naled ở nồng độ 0,01% đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của *Fusarium graminearum* và sự hình thành zearalenon. Ngoài ra còn được dùng để chống nấm mốc và sự hình thành độc tố trong ngô hạt.

** Methyl bromide*

Methyl bromide (CH_3Br) là một chất chống mốc đối với nấm đất và côn trùng ở hạt. Người ta đã nghiên cứu tác dụng của methyl bromide đối với nhiều loài nấm mốc như *A. parasiticus* và *P. ruben* ở gạo. Ở hàm lượng 30-40 mg, methyl bromide có thể tiêu diệt 10^4 - 10^5 bào tử nấm trong 1g ngô. Các loài nấm sinh độc tố như *A. flavus*, *A. ochraceus*, *P. citrinum* cũng hoàn toàn bị tiêu diệt bởi methyl bromide. Một số công trình cho thấy nếu dùng chất này liều 120 mg/lít (0,012%) thì trong 4 giờ đầu 100% các bào tử nấm bị diệt.

** Methyl xanthine*

Các methyl xanthine tự nhiên có trong các loại hạt cũng có tác dụng chống nấm mốc. Nhiều nghiên cứu cho thấy

cafein ở hàm lượng 0,1% ức chế có tính chọn lọc các loài nấm mốc. Cafein cũng ức chế sự phát triển của *A. flavus* và sản sinh Aflatoxin. Ở nồng độ 0,05%; 0,07% và 0,2% cafein làm giảm sự phát triển của nấm mốc tương ứng là: 18; 84 và 83%. Cũng ở nồng độ trên, sự sản sinh Aflatoxin đã bị giảm thấp đáng kể.

Hạt cà phê còn xanh được làm mất hoạt chất cafein vẫn có tác dụng hạn chế nấm *A. flavus* sản sinh độc tố. Các methyl xanthine được tìm thấy trong coca cũng có tác dụng kháng nấm và sản sinh độc tố. Theophyllin hàm lượng 0,8% trong môi trường nuôi cấy tổng hợp ức chế được 54% Aflatoxin do *A. parasiticus* sản sinh. Theobromin cũng đã được thử nghiệm nhưng không thấy có các tác dụng trên.

h) Ảnh hưởng của oxy đến sự phát triển của nấm

Nấm mốc giảm phát triển với nồng độ oxy là 0,1% và 21% là CO₂ nhưng không ngăn cản được sự phát triển. Hệ nấm mốc có sự phát triển khác nhau tùy theo độ ẩm và nhiệt độ. Ở độ ẩm 80% và nhiệt độ 25°C thì *Penicillium* phát triển, 30°C thích hợp với *Aspergillus*, *Euroticus* ở 35°C và *Mucor* ở 45°C.

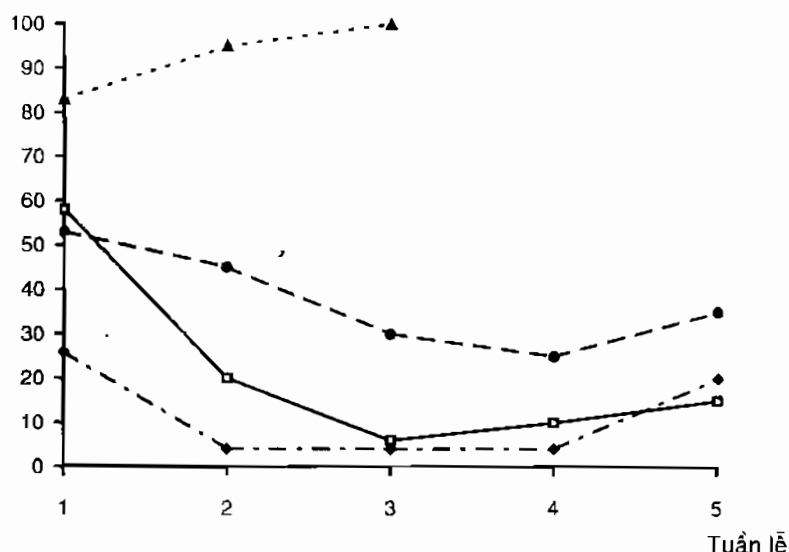
Nhiều thí nghiệm cấy *A. flavus* và *F. moniliforma* ở ngô sau thu hoạch có độ ẩm cao (29,4%) và ngô làm ướt 19,6%, được đưa vào điều kiện bảo quản N₂ (99,7%) cho thấy ức chế sự phát triển của nấm.

Wall và Uota (1970) cho thấy *Alternaria alternata*, *Boytritis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* và *Cladosporin herbarum* phát triển kém dần theo nồng độ CO_2 từ 10, 20, 30 và 45% với 21% O_2 .

*Ảnh hưởng của bảo quản ngô hạt ở các điều kiện
có các thành phần không khí khác nhau*

(Theo Willson và cs, 1975)

% hạt bị nhiễm



—●— CO_2 (13,5%) + O (0,5%) + N (84,8%)

-●- CO_2 (61,7%) + O (8,7%) + N (29,6%)

—■— N (99,7%) + O (0,3%)

-▲- Không khí bình thường

50% các loài nấm mốc trên bị ức chế trong không khí có 20,9% CO₂. *Fusarium roseum* phát triển tốt khi có 10% CO₂ và bị ức chế phát triển 50% khi trong không khí có 45% CO₂.

4.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN HUỶ AFLATOXIN

4.2.1. Phương pháp vật lý học

a) Phân huỷ Aflatoxin bằng không khí nóng

Phương pháp dùng không khí nóng thổi qua nguyên liệu có chứa Aflatoxin để làm giảm thiểu lượng Aflatoxin đã được nhiều tác giả (Lee, 1969; Waltking 1971; Elkady, 1981; Frank, 1974) nghiên cứu.

Phương pháp này cũng đã đem lại nhiều kết quả đáng kể. Ở lạc hạt, nếu sức nóng 130°C trong vòng 5 phút có thể làm giảm lượng Aflatoxin B₁ từ 2000 ppb xuống 1000 ppb. Lượng Aflatoxin giảm còn liên quan đến sự có mặt của các Aflatoxin khác như Af.B₂, Af.G₁ v.v... Kết quả một số thí nghiệm cho thấy Aflatoxin B₁ giảm 70% còn lượng Aflatoxin B₂ chỉ giảm từ 47-52%. Trong các thí nghiệm khác lại thấy Aflatoxin B₁ giảm được 69% và Aflatoxin G₁ chỉ giảm 67%.

Trong nông nghiệp thường dùng phương pháp này để làm khô và giảm Aflatoxin ở ngô hạt. Nếu nhiệt độ thổi gió là 100-145°C lượng Aflatoxin B₁ có thể giảm từ 877 ppb còn 452 ppb, từ 378 còn 213 ppb, từ 133 ppb còn 80 ppb và từ 80 ppb còn 25 ppb. Nếu tăng nhiệt độ thổi lên tới 165°C có thể làm cho lượng Aflatoxin B₁ giảm từ 66-77%.

h) Phân huỷ Aflatoxin bằng hấp ướt ở áp suất cao

Phương pháp hấp ướt ở nhiệt độ cao dưới áp lực hơi nước đem lại kết quả khả quan hơn. Quá trình này phá vỡ nhanh chóng vòng lactam trong cấu trúc phân tử Aflatoxin. Coomes (1966), Elkady (1981) và một số tác giả đã chứng minh lượng Aflatoxin có thể giảm thiểu tới mức không thể phát hiện được bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Ở lạc có độ ẩm 10%, chứa 7000 ppb Aflatoxin B₁ được hấp ướt ở 120°C trong 4 giờ, lượng Aflatoxin B₁ đã giảm còn 370 ppb. Ở hàm lượng Aflatoxin thấp (760 ppb) được hấp ở 1,5 atm trong vòng 1 giờ đã phân huỷ hoàn toàn Aflatoxin.

Rehana (1979) nhận thấy nếu gạo nhiễm Aflatoxin từ 40-4000 ppb được hấp ướt trong 5 phút ở 120°C (thêm nước vào gạo tỷ lệ là 1:4) có thể làm giảm hàm lượng Aflatoxin B₁ tới 68%.

Nhiều thí nghiệm khác được tiến hành bằng phương pháp đun nấu thông thường (nhiệt độ = 100°C), song kết quả cho thấy hoàn toàn không giảm được lượng Aflatoxin có trong mẫu phân tích. Khi đun sôi nguyên liệu nấu bia ở 100°C vẫn tìm thấy 90% lượng Aflatoxin so với lượng độc tố có mặt ban đầu. Shank (1972) đã phát hiện thấy trong thức ăn nấu chín ở Thái Lan một lượng Aflatoxin tới 748 ppb và 1299 ppb.

Tuy nhiên, độ bền vững của Aflatoxin trong quá trình đun sôi còn phụ thuộc vào hàm lượng nước chứa trong hạt. Theo

Rehana (1979), nếu luộc gạo với nước theo tỷ lệ 1:4 trong vòng 30 phút đã làm giảm 50% lượng Aflatoxin. Nếu tỷ lệ đó là 1:8 giảm tới 67% lượng độc tố. Như vậy, trong quá trình đun sôi, nếu thêm nước vào sẽ thúc đẩy nhanh quá trình phân huỷ Aflatoxin. Ranh giới nhiệt độ để phân huỷ được Aflatoxin cũng rất quan trọng. Nếu nhiệt độ nhỏ hơn 100°C thì khả năng phân huỷ độc tố hầu như không xảy ra. Người ta đã ngâm hạt bông có 20% ẩm trong 90 phút ở nhiệt độ 60°C nhưng lượng Aflatoxin B₁ không bị giảm đi, lượng Aflatoxin B₁ và G₂ chỉ giảm được từ 1,7% và 2,8%.

Sự giảm Aflatoxin trong điều kiện đun nấu còn phụ thuộc vào pH của mẫu phân tích. Nếu ở pH = 1, nhiệt độ ngâm là 40°C thì Aflatoxin B₁ có thể chuyển thành Aflatoxin B_{2a} và Aflatoxin G₁ thành Aflatoxin G_{2a}.

Trong sữa được hấp tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur, lượng Aflatoxin M₁ đã không bị giảm. Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả cho thấy, sự giảm Aflatoxin M trong sữa còn chịu ảnh hưởng của nhiệt độ tiệt trùng. Nếu sử dụng nhiệt độ 75°C trong 4 giây, 62°C trong 30 phút, 74°C trong 30 phút thì tỷ lệ độc tố tương ứng giảm được là 12, 35 và 40%. Tuy nhiên theo Kiermeier (1977), bản thân sự phân huỷ này còn phụ thuộc vào Aflatoxin B₁ con vật ăn phải được đào thải qua sữa, hay thí nghiệm bổ sung Aflatoxin M₁ vào sữa. Những nghiên cứu khác cũng cho thấy, nếu hấp ướt bột lạc ở 1,5 atm, sau đó

sấy khô ở 80-105°C thì bột lạc gần như đạt giới hạn an toàn cho vật nuôi (Elkady, 1981).

c) Làm giảm Aflatoxin bằng phương pháp hấp phụ

Aflatoxin có thể được hấp phụ bởi các chất hấp phụ như: vermicullit, montmorillonit, bentonit, sepiolit v.v... Nếu thử các chất hấp phụ trên ở hàm lượng 1g, thêm 50ml dung dịch đậm photphat (pH = 6), ủ trong 5 ngày thì khả năng hấp phụ Aflatoxin có thể đạt 100%. Decker và Corby (1980) nghiên cứu và sử dụng than gỗ hoạt tính để hấp phụ các mycotoxin trong đó có Aflatoxin đã thu được kết quả tốt. Người ta đã tiến hành thí nghiệm trên 2 nhóm vật nuôi. Nhóm đối chứng ăn thức ăn nhiễm Aflatoxin, thức ăn của nhóm thí nghiệm đã được hấp phụ qua than củi hoạt tính. Kết quả cho thấy nhóm vật nuôi đối chứng bị chết trong khi nhóm được ăn thức ăn qua hấp phụ vẫn khỏe mạnh.

Bên cạnh đó một số các hợp chất như silicagel, polyme cao phân tử cũng được thử nghiệm khả năng hấp phụ toxin trong thức ăn chăn nuôi. Quá trình hấp phụ xảy ra trên bề mặt các cao phân tử. Do sự gắn các toxin vào các nhóm hydro. Eheberster (1980) nhận thấy khả năng hấp phụ độc tố trong in vitro thí nghiệm với các độc tố chuẩn như Aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂ giảm tới 61, 37, 46 và 35%. Kết quả được chứng minh qua việc nuôi vịt thí nghiệm. Người ta thấy những biểu hiện bệnh lý ở gan qua giải phẫu đã giảm rõ rệt vẫn phát hiện được

những dấu vết của Aflatoxin trong gan. Kết quả cũng được quan sát thấy trên gà thí nghiệm, trên lợn và gà đẻ. Các vật nuôi thí nghiệm phát triển bình thường và tăng trọng hơn so với đối chứng.

d) Phân huỷ Aflatoxin bằng nhiệt

Aflatoxin bền vững với nhiệt độ. Điều này cũng phù hợp với nhiệt độ nóng chảy của các Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ và Aflatoxin M₁, M₂ lần lượt là 268, 386, 244, 230, 299°C (Milczewski, 1981). Người ta đã đun nóng 500 ppb Aflatoxin trong dầu ở 160°C, sau 30 phút vẫn còn 400 ppb độc tố. Tiếp tục đun 30 phút nữa Aflatoxin vẫn không bị phá huỷ.

Dầu ngô và dầu lạc nhiễm Aflatoxin được đun nóng tới 250°C mà độc tố vẫn tồn tại. Tuy nhiên sự giảm Aflatoxin trong hạt lạc hay ngô bằng phương pháp sấy nóng có kết quả khả quan hơn. Nguyên do là bởi sự có mặt của nước trong các hạt. Hanssen (1969) nhận thấy, nếu sấy lạc ở 160°C trong 30 phút thì lượng Aflatoxin giảm từ 100 ppb còn 5 ppb, nếu ở 190°C trong 10 phút thì lượng độc tố còn lại là 20 ppb.

e) Tách Aflatoxin bằng dung môi hữu cơ

Đây là phương pháp có thể áp dụng đối với thức ăn và nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi, đặc biệt là hạt lạc và hạt bông. Methanol được sử dụng như một dung môi thích hợp cho việc tách độc tố, ngoài ra còn có ethanol, axeton, cloroform, hỗn hợp axeton và nước, methanol và nước, hỗn

hợp hexan-axeton-nước, v.v... Khả năng chiết xuất Aflatoxin bằng các dung môi hữu cơ còn phụ thuộc vào nhiệt độ dung môi. Tuy nhiên mục đích chiết tách Aflatoxin trong nguyên liệu còn cần được hạch toán kinh tế. Vì vậy chỉ dùng hỗn hợp methanol - nước là tương đối phù hợp về giá thành. Một thí nghiệm sử dụng methanol để tách Aflatoxin ra khỏi ngô ở tỷ lệ 5:1 đã cho kết quả rất khả quan. Gần như ngô đã trở nên vô độc đối với vẹt, sau đó methanol thu hồi được lọc qua than hoạt và có thể tiếp tục sử dụng lại. Các tác giả Screenivasamurthy (1965), Forsyth (1976) cũng cho biết, rửa các nguyên liệu chỉ chứa Aflatoxin (như ngô) bằng dung dịch 1% clorua canxi (CaCl_2) có thể làm giảm tới 80% lượng Aflatoxin. Nếu sử dụng nước có 1% bicacbonat natri (NaHCO_3), lượng độc sẽ giảm 100% (lượng ban đầu là 10 ppm). Tuy nhiên quá trình rửa cũng làm giảm hàm lượng protein tới 6%. Người ta có thể loại bỏ 80% Aflatoxin trong dầu lạc bằng cách sử dụng nước muối 10% (NaCl) theo tỷ lệ 1:4 ở nhiệt độ 90°C trong 30 phút.

f) Phân huỷ Aflatoxin bằng các tia xạ

Aflatoxin rất mẫn cảm với tia cực tím (UV light). Nhiều tác giả đã nghiên cứu khả năng làm giảm Aflatoxin bằng tia cực tím. Ở bước sóng 365nm, khả năng hấp phụ của Aflatoxin đạt cực đại. Okonkwo (1978) nhận thấy, lượng Aflatoxin ở ngô (150 ppb và 250 ppb) có thể giảm 30% và 16% trong 10 giờ tiếp xúc với ánh nắng mặt trời. Các nhà khoa học ở Ấn

Độ cứng kháng định, dưới tác động của ánh sáng mặt trời Aflatoxin B₁ trong bột lạc sẽ giảm từ 83% xuống 50%.

Các tia xạ như tia γ đã được nghiên cứu để làm giảm Aflatoxin trong hạt. Thí nghiệm được tiến hành ở liều 1; 5; 10 và 15 Mrad (Mega rad) để chiếu vào các dung dịch có chứa Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂. Chỉ ở liều 10 Mrad mới có thể làm giảm đáng kể hàm lượng Aflatoxin. Tuy nhiên, việc chiếu tia xạ để làm giảm Aflatoxin trong nguyên liệu đã không mang lại ý nghĩa kinh tế. Theo Adamiker (1978), nếu sử dụng liều 3 Mrad để chiếu vào thức ăn chăn nuôi đã làm giảm các chất dinh dưỡng, đặc biệt là các axit amin cũng không gây nguy hiểm cho động vật thí nghiệm nuôi bằng thức ăn được chiếu tia xạ. Nhưng ở liều lượng này, Aflatoxin đã không bị phá huỷ. Nếu sử dụng liều 10 Mrad sẽ gây ảnh hưởng xấu đến các thành phần dinh dưỡng trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi (Frank, 1970).

Từ các phương pháp vật lý nhằm phân huỷ Aflatoxin đã nêu trên, có thể nhận xét như sau:

Việc loại bỏ hoặc làm giảm lượng Aflatoxin bằng phương pháp cơ học và vật lý học có thể mang lại những kết quả khả quan. Người ta tách bằng thủ công hay bằng các máy tách hạt bị hư hỏng, biến màu ra khỏi khối lượng hàng hóa để có thể tránh được một phần khả năng nhiễm Aflatoxin.

Phương pháp phơi khô hay rửa bằng nước có chứa các dung môi hữu cơ không hoàn toàn loại bỏ được Aflatoxin.

Tuy nhiên, phương pháp này có ý nghĩa thực tiễn vì đơn giản dễ làm, đặc biệt đối với các nước nhiệt đới có nhiều ánh sáng mặt trời, điều kiện phơi khô thuận lợi. Nhưng hoàn toàn không phù hợp với các nguyên liệu đã xay nghiền từ hạt thành dạng bột.

Phương pháp chiết bằng các dung môi hữu cơ có thể lấy ra phần lớn lượng Aflatoxin trong hàng hóa. Nó đã được áp dụng thành công ở nhiều nước và đặc biệt đối với bột lạc và dầu lạc.

Phương pháp hấp phụ qua than hoạt đặc biệt có hiệu quả đối với Aflatoxin, patulin và các mycotoxin khác. Phương pháp làm vô hoạt độc tố nấm bằng nhiệt còn phụ thuộc vào các yếu tố như lượng nước có trong cơ chất, áp suất, thời gian và nhiệt độ sấy v.v... trong đó hấp ướt dưới áp suất cao có hiệu lực hơn cả. Sự phân huỷ các mycotoxin có thể xảy ra ở 100°C, thấp nhất là 60°C. Citrinin là độc tố nấm mốc dễ bị phân huỷ bởi nhiệt, các độc tố khác như Ochratoxin, Patulin, Zearalenon... lại tương đối bền vững với nhiệt. Aflatoxin là độc tố bền vững nhất ở nhiệt độ cao.

Aflatoxin có thể bị phân huỷ bởi tia cực tím, thậm chí khi phơi nắng. Tia ion cũng có thể phân huỷ được Aflatoxin, tuy nhiên liều cần thiết là rất cao và do đó ảnh hưởng tới chất lượng của thực phẩm, thức ăn và nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi.

4.2.2. Phương pháp hoá học

Phương pháp hoá học sử dụng nhằm vô hoạt hay giảm lượng Aflatoxin trong thức ăn và nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi đã được nhiều tác giả nghiên cứu và được ứng dụng ở nhiều nơi.

a) Phương pháp sử dụng các chất oxy hoá khử

Các chất oxy hoá khử như natri hypochlorit (NaOCl), oxy già (H_2O_2) được sử dụng để làm mất độc tính của Aflatoxin. Natri hypochlorit được dùng làm sạch các dụng cụ phòng thí nghiệm. Người ta đã chứng minh khả năng làm vô hoạt Aflatoxin B_1 có thể chuyển thành dạng Aflatoxin $\text{B}_{1,2,3}$ dichlorid, là một chất rất nguy hiểm có thể gây ung thư và đột biến. Vì vậy, khi dùng NaOCl để khử Aflatoxin B_1 thường kết hợp với axeton hàm lượng 5%.

Cũng có thể sử dụng hỗn hợp NaOCl và H_2O_2 để phân huỷ Aflatoxin. Người ta còn dùng hỗn hợp 16,5% NaCl và 1% NaOCl để xử lý mẫu. Thí nghiệm trên bột gạo được xử lý bằng dung dịch trên trong 24 giờ đã tách được hoàn toàn Aflatoxin ra khỏi mẫu thử. Chakrabart (1981) nhận thấy, khi mẫu được xử lý bằng dung dịch 3% H_2O_2 trong 1 giờ ở 65°C , lượng Aflatoxin B_1 trong ngô giảm từ 379 ppb còn 20 ppb. Nhiều tác giả khác cũng cho biết, có thể loại bỏ hoàn toàn Aflatoxin B_1 bằng hỗn hợp 2% NaOCl và 12% H_2O_2 ở điều kiện bình thường. Một số nghiên cứu khác sử dụng H_2O_2 trong

30 phút ở pH = 9,5 và 80°C cho kết quả rất khả quan: không những Aflatoxin bị phân huỷ hoàn toàn mà còn đảm bảo an toàn khi thí nghiệm lại trên vịt và trên phôi gà. Tuy nhiên sử dụng NaOCl để xử lý hạt nhiễm Aflatoxin có thể làm mất màu sắc của hạt và biến chất các axit amin.

Khi ozon (O_3) cũng được thử nghiệm về khả năng phân huỷ Aflatoxin trong mẫu đạt hiệu quả tốt, song có bằng chứng là chất lượng các thành phần của thức ăn bị giảm đặc biệt là protein.

b) Phương pháp sử dụng các chất kiềm

Hydroxit amon (NH_4OH) và hydroxit natri ($NaOH$) là 2 chất kiềm được thử nghiệm làm vô hoạt Aflatoxin. Các chất này đều có hoạt tính mạnh, có thể phá vỡ vòng lactam trong cấu trúc phân tử Aflatoxin. Tùy điều kiện thí nghiệm mà các sản phẩm phân huỷ Aflatoxin có những trọng lượng phân tử khác nhau. Người ta đã xác định được một số chất có trọng lượng phân tử 286 và 256. Aflatoxin D_1 là sản phẩm phân huỷ có trọng lượng phân tử bằng 286. Quá trình hình thành Aflatoxin D_1 dưới tác động của ion NH_3 làm mở vòng lactam và làm mất cacbon của axit keto. Ở nồng độ nguyên của NH_4OH , trong 100°C và 1 giờ tiếp xúc đã có 10% Aflatoxin D_1 hình thành từ Aflatoxin B_1 .

Schroeder (1968) đã lập mô hình thí nghiệm với Aflatoxin đánh dấu nguyên tử hydro (3H -Aflatoxin B_1) trong

một thời gian tiếp xúc là 4 giờ ở 100°C và 25% NH_4OH thì có 31% Aflatoxin B_1 chuyển thành Aflatoxin D_1 .

Hợp chất được phân giải có trọng lượng phân tử bằng 206 được phát hiện bị mất đi vòng lactam và vòng zylopentan. Một chất khác là sản phẩm phân giải tiếp theo của phân tử Aflatoxin D_1 do bị mất nhóm methoxy có trọng lượng phân tử là 256. Trong điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm, Aflatoxin được tiếp xúc với NH_4OH đậm đặc trong 18 ngày đã phát hiện được những thành phần không bị hoà tan trong axeton nhưng không xác định được sản phẩm phân giải loại gì. Chất được xác định tiếp theo trong những thí nghiệm khác là axit O-cumarin.

Tuy tác dụng của các kiểm chất phân giải Aflatoxin đã được chứng minh bằng sự mất màu xanh huỳnh quang dưới ánh sáng tử ngoại (UV), song trên động vật thí nghiệm thì không an toàn. Điều này đã được kiểm với *Artamia salina* và tính đột biến trong thí nghiệm trên *Samonella* (Ames-test). Như vậy độc tính của Aflatoxin không chỉ phụ thuộc vào vòng lactam mà còn phụ thuộc vào vòng furan trong phân tử. Theo nghiên cứu của Vesonder (1975), nếu thời gian tiếp xúc của Aflatoxin với NH_4OH trong 18 ngày ở nhiệt độ 60°C, độc tố sẽ bị phân huỷ hoàn toàn và không gây độc cho phôi trứng thử nghiệm. Nhưng theo Draughon (1982), dù tăng cường hàm lượng NaOH hay NH_4OH , vẫn còn từ 6-10% Aflatoxin B_1 tồn tại trong sản phẩm thử nghiệm. Do vậy theo tác giả,

cần thận trọng khi sử dụng các sản phẩm phân huỷ toxin bằng con đường này nếu như trong nguyên liệu có chứa nhiều Aflatoxin.

Ngoài ra, hydroxit canxi Ca(OH)_2 , natri cacbonat (Na_2CO_3) cũng đã được thử nghiệm và cho hiệu quả cao. Trong những thí nghiệm khác, người ta còn kết hợp giữa monomethyramin và natri cacbonat.

c) Phương pháp sử dụng khí NH_3

Nhiều thí nghiệm đã chứng minh hiệu quả hiển hiện của việc dùng khí NH_3 làm vô hoạt Aflatoxin. Ngay trong thực tiễn ở nhiều nước, phương pháp này đã và đang được sử dụng.

Thí nghiệm trên hạt bông được xử lý bằng khí NH_3 cho thấy rất thành công, đặc biệt trong điều kiện nâng cao nhiệt độ và áp suất. Ở nhiệt độ 121°C và 1,5 atm chỉ trong 30 phút, hạt bông có chứa 317 ppb và 545 ppb Aflatoxin B_1 đã giảm xuống còn 1 và 3 ppb.

Để thuận tiện cho việc ứng dụng trong thực tiễn, những thí nghiệm trong điều kiện bình thường đã được áp dụng. Theo Jorgensen (1981), nếu hạt bông đựng trong các túi polyethylen kín chứa 2% khí NH_3 ở 43°C , hàm lượng độc tố có thể giảm từ 800 ppb còn 200 ppb. Ở điều kiện bình thường và áp lực bình thường, tác dụng của NH_3 phân huỷ Aflatoxin cần kéo dài tới 15 ngày. Nếu hàm lượng nước của vật liệu thấp (7,5%), tác dụng của NH_3 sẽ kém, vì vậy cần nâng độ ẩm cơ chất lên 15; 17 hoặc 20% để đạt hiệu quả tốt hơn.

Price (1982) đã xử lý 50 tấn hạt bông có độ ẩm bằng 17%, nhiễm 400-7000 ppb Aflatoxin B₁, đựng trong các túi nhựa chứa 1,5% NH₃ ở nhiệt độ và áp lực bình thường, thời gian xử lý kéo dài 21 ngày. Kết quả phân tích mẫu sau khi xử lý cho thấy chỉ còn 20 ppb Aflatoxin B₁ được xác định.

Các nghiên cứu trên lạc và ngô cũng cho kết quả rất tốt. Cheelkowski (1981) đã thử nghiệm trên lạc chứa lượng Aflatoxin bằng 1842 ppb được tiếp xúc với 2% khí NH₃ ở nhiệt độ 43°C trong 5 tuần lễ, kết quả hầu như 100% Aflatoxin bị phân huỷ. Cũng theo tác giả trên, nếu nhiệt độ bên ngoài khoảng 30°C thì trong 11 tuần, lượng Aflatoxin có trong lạc có thể giảm tới 95%.

Xử lý ngô hạt bằng khí NH₃ được đặc biệt quan tâm ứng dụng hơn cả. Người ta nhận thấy, nếu hàm lượng NH₃ là 0,5-1,5% và nhiệt độ bên ngoài là 25°C, trong 14 ngày tiếp xúc, lượng Aflatoxin từ 200 ppb có thể giảm xuống còn 10 ppb. Tuy nhiên để có hiệu quả xử lý nhanh hơn và tiết kiệm hơn, phương pháp bơm khí luân chuyển (Recycle - Techniques) đã được sử dụng nhằm mục đích tăng tiếp xúc của khí NH₃ với nguyên liệu xử lý. Kết quả thí nghiệm như sau: nếu trong 14 ngày tiếp xúc, độ ẩm ngô hạt là 17,5% và nhiệt độ môi trường 25°C, độc tố trong ngô bị phân giải còn 10 ppb từ 1000 ppb ban đầu. Nhiều tác giả khác cũng khẳng định, nếu ngô bị nhiễm Aflatoxin, đựng trong các túi chất dẻo chứa từ 1-1,5% khí NH₃ và để qua mùa đông chắc chắn sẽ có tác dụng tốt.

Việc áp dụng khí NH_3 để xử lý khối lượng ngô lớn cũng đạt được những hiệu quả tốt. Brekke (1977) đã xử lý 29 tấn ngô bị nhiễm tới 750 ppb Aflatoxin bằng 1,5% NH_3 theo phương pháp Recycling trong 13 ngày đã làm giảm lượng Aflatoxin xuống còn 7 ppb. Guthrie (1979) đã dùng phương pháp thổi khí NH_3 qua các túi đựng 380 tấn ngô bị nhiễm Aflatoxin hàm lượng 272 ppb trong 48 giờ. Kết quả hàm lượng Aflatoxin chỉ còn 29 ppb.

** Tính an toàn và ảnh hưởng của khí NH_3 đến giá trị dinh dưỡng của nguyên liệu được xử lý*

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, xử lý nguyên liệu nhiễm Aflatoxin bằng khí NH_3 hoàn toàn không gây độc hại cho động vật thí nghiệm nuôi bằng thức ăn chế tạo từ nguyên liệu đó. Thí nghiệm của Brekke (1977) cho thấy, ngô nhiễm 1600 ppb Aflatoxin được xử lý bằng khí NH_3 đã không gây chết vịt và phôi trứng gà. Nếu đem ngô cho lợn ăn, không phát hiện thấy sự biến đổi bệnh lý ở gan. Những thí nghiệm trên gà cũng không thấy hệ thống miễn dịch bị ảnh hưởng do ăn thức ăn nêu trên. Bằng chứng còn được ghi nhận ở chuột: hoạt độ men photphataza kiềm không thay đổi. Bằng phương pháp phóng xạ đánh dấu cacbon (^{14}C) cũng nhận thấy rất ít sự kết hợp giữa Aflatoxin B_1 với phân tử ADN trong tế bào gan gà được ăn thức ăn qua xử lý này. Cũng như các thí nghiệm trên, kết quả là hàm lượng Aflatoxin M_1 trong sữa bò rất thấp.

Kết quả nghiên cứu đặc tính của các chất phân giải từ Aflatoxin B₁ trong ngô cũng cho thấy chỉ những trường hợp hàm lượng độc tố ban đầu quá cao (hàng nghìn ppb) mới gây nguy cho phôi trứng. Các hàm lượng toxin thấp (vài chục ppb) đã không thể hiện độc tính trên động vật thí nghiệm ăn thức ăn qua xử lý (Beckwith, 1975). Tuy nhiên, Schroeder (1981) đã xử lý ngô nhiễm độc tố (27,6 ppb trong thức ăn) bằng khí NH₃, 43 ngày ở điều kiện bình thường thấy các chất phân giải hoà tan trong nước vẫn còn độc tính rất đáng kể.

Khí NH₃ cũng làm thay đổi mùi vị và màu sắc của hạt, giảm hàm lượng cystin trong hạt. Nhưng vẫn có thể khắc phục bằng cách bổ sung thêm methionin vào khẩu phần thức ăn.

d) Phương pháp sử dụng formaldehyd, bisunfit và axit

Formaldehyd, bisufit và axit cũng có thể phân giải được Aflatoxin. Hàm lượng Aflatoxin trong bột lạc được tiếp xúc với 2% formaldehyd ở 100-200°C đã hoàn toàn giảm. Tác dụng phân giải độc tố của formaldehyd còn mạnh hơn nếu kết hợp với hydroxit canxi (Ca(OH)₂).

Doyle (1978) đã thí nghiệm loại bỏ Aflatoxin trong mẫu phân tích bằng dung dịch sunphit kali (K₂SO₃) 0,05M (tương đương với 3000 mg/kg SO₂) ở nhiệt độ 25°C và pH bằng 5,5. Kết quả 50% Aflatoxin B₁ bị phân huỷ trong thời gian 127-163 giờ. Nếu nâng nhiệt độ lên thì khả năng phân giải độc tố sẽ mạnh hơn. Aflatoxin B₁ trong ngô cũng bị phân huỷ bởi

NaHSO_3 trong 24 giờ ở nhiệt độ 24°C . Ngoài ra, cũng có thể dùng bisunfit để xử lý Aflatoxin M_1 trong sữa.

Khả năng phân huỷ Aflatoxin B_1 của bisunfit là do phá vỡ vòng lactam, còn ảnh hưởng của bisunfit và formaldehyd hạn chế độc hại Aflatoxin đối với động vật thí nghiệm vẫn chưa được phát hiện.

Các axit có tác dụng biến đổi Aflatoxin B_1 và G_1 thành Aflatoxin B_{2a} và G_{2a} . Sự chuyển biến trên còn phụ thuộc vào độ pH và nhiệt độ dung dịch. Nếu pH bằng 3 và nhiệt độ dung dịch là 40°C thì quá trình trên xảy ra trong 214 giờ và làm biến đổi 95% Aflatoxin B_1 . Người ta cũng chứng minh được Aflatoxin B_{2a} và G_{2a} rất ít độc đối với các động vật thí nghiệm như vịt và phôi gà so với Aflatoxin B_1 .

4.2.3. Phương pháp sinh vật

Các loài nấm men, mốc, vi khuẩn, xạ khuẩn đã được thử nghiệm về khả năng phân huỷ Aflatoxin.

Ciegler (1996) nhận thấy *Flavobacterium aurantiacum* có thể phân huỷ hoàn toàn Aflatoxin có trong mẫu phân tích. Chủng này còn được sử dụng để loại bỏ Aflatoxin M_1 trong sữa, bơ, lạc, ngô. Các nguyên liệu này sử dụng làm thức ăn cho vịt đảm bảo an toàn.

Rhizopus stolonifer phân huỷ được Aflatoxin G_1 . *Rhizopus arrhizus* có thể làm giảm chức năng ketone trong

vòng cyclopentan của Aflatoxin B₁, tạo thành những chất ít độc hơn và xác định bằng phương pháp đánh dấu nguyên tử (C¹⁴).

Aspergillus parasiticus cũng có thể tác động lên Aflatoxin qua hệ thống men của sợi nấm. Tuy nhiên, tác dụng này còn phụ thuộc vào chủng loại nấm, nhiệt độ, độ pH và hàm lượng Aflatoxin trong môi trường.

Corynebacterium rubrum và *Aspergillus niger* chuyển hoá Aflatoxin B₁ thành Aflatoxin R₀. *Tetrahydema pyriformis* làm giảm 58% Aflatoxin B₁ trong thời gian nuôi cấy 24 giờ và 67% trong 48 giờ.

Hiện nay, đã chọn được một số dạng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có tác dụng hạn chế ảnh hưởng xấu của Aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi. Đã có một số chế phẩm được sản xuất từ chủng này như chế phẩm Yea-sac của hãng Agritech Sài Gòn (Hãng Bayer).

Bộ môn vệ sinh thú y - Viện Thú y Quốc gia cũng sử dụng một số dạng nấm men dưới dạng bào tử sống bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, rất thuận tiện cho sử dụng. Các chế phẩm này không những hạn chế được tác dụng xấu của Aflatoxin mà còn giúp tăng trọng và giảm bệnh đường tiêu hoá ở vật nuôi.

Chế phẩm cao Astiso cũng được nghiên cứu tại Khoa Chăn nuôi thú y, Trường Đại học Nông nghiệp I để bổ sung vào nước uống nhằm tăng cường công năng giải độc gan, giúp

đào thải nhanh Aflatoxin ra khỏi cơ thể. Kết quả kiểm tra đã không phát hiện thấy sự tồn dư của độc tố trong các sản phẩm chăn nuôi (thịt, gan...). Actiso đã góp phần làm tăng năng suất vật nuôi, đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm và chống ô nhiễm môi sinh.

Những chế phẩm sinh học này rất đáng được quan tâm sử dụng vì giá thành rẻ, sử dụng thuận tiện, có lợi cho sản xuất, tạo ra thực phẩm sạch, bảo đảm sức khỏe và quyền lợi cho người tiêu dùng.

4.3. SỬ DỤNG THỨC ĂN VÀ NGUYÊN LIỆU BỊ NHIỄM AFLATOXIN

Nấm mốc và độc tố của chúng trong thức ăn chăn nuôi đã được chứng minh là gây thiệt hại về giá trị dinh dưỡng và gây bệnh cho vật nuôi. Ở Việt Nam trong nhiều năm qua, các vụ gây chết lợn ở trại lợn Sông Bôi (Hoà Bình), các trại Mường Hồng, Tô Hiệu (Sơn La), các vụ gây chết gà, vịt ở các trại chăn nuôi tập trung thuộc miền Bắc, miền Nam có nguyên nhân trong thức ăn chứa những hàm lượng lớn độc tố nấm mốc. Kết quả nghiên cứu từ 1986 đến nay của các tác giả Đậu Ngọc Hào, Nguyễn Thị Thuận và các cộng sự (Bộ môn Vệ sinh thú y - Viện Thú y quốc gia), Nguyễn Như Viên (Trường Đại học Nông nghiệp I), Dương Thanh Liêm (Trường Đại học Nông nghiệp IV) v.v... đều khẳng định tỷ lệ nhiễm Aflatoxin B₁ ở khô lạc và ngô khá cao, chiếm 90% mẫu phân tích, có

mẫu nhiễm tới hàng ngàn ppb v.v... Điều đó cho thấy mức độ nghiêm trọng của nguyên nhân gây bệnh từ nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi.

Trong điều kiện nhiệt độ và độ ẩm thích hợp ở nước ta, sự nhiễm nấm mốc và độc tố của chúng trong thức ăn chăn nuôi là khó tránh khỏi. Những kết quả nghiên cứu trong 10 năm trở lại đây chủ yếu tập trung vào Aflatoxin. Tuy nhiên còn hàng chục các độc tố nấm mốc khác cũng rất nguy hiểm mà chưa được nghiên cứu như Ochratoxin A, B, C do *Aspergillus ochraceus*, *Trichothecenes* toxin của *Fusarium*, gồm các độc tố quan trọng như T-2 toxin, Nivalenol, Deoxynivalenon, Diacetocirpenol (DAS), Fumonisin, Zearalenon và độc tố của *Penicillium* spp. như Citrinin, Patulin, Luteoskyrin v.v... cũng rất nguy hiểm đối với vật nuôi.

Ngành chăn nuôi ngày càng phát triển thì nhu cầu về thức ăn gia súc ngày càng nhiều. Nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi không thể bị bỏ đi do nhiễm nấm mốc và độc tố của chúng. Do vậy cần phải có sự hiểu biết về nấm mốc và độc tố của chúng để sử dụng có hiệu quả nguồn nguyên liệu này.

Ở Việt Nam, khô dầu lạc là nguồn nguyên liệu rất phong phú, song do sợ bị nhiễm Aflatoxin nên trong vài năm trở lại đây đã ít được sử dụng cho chăn nuôi và điều đó gây lãng phí rất lớn.

Như các tài liệu đã trình bày ở trên, gia súc, gia cầm mắc bệnh với Aflatoxin ở mức độ khác nhau theo loài, giống, lứa

tuổi, giới tính và điều kiện chăn nuôi, do đó nguyên liệu nhiễm Aflatoxin có thể không sử dụng cho loài này, song lại sử dụng được cho loài khác. Ví dụ như vịt rất mẫn cảm với Aflatoxin, hàm lượng độc tố 20 ppb đã gây những ảnh hưởng xấu về bệnh lý, song ở gà thì liều gây độc lớn gấp hàng chục lần. Vì vậy, không nên dùng các loại thức ăn nhiễm Aflatoxin như ngô, khô dầu lạc cho chăn nuôi vịt. Đại gia súc như trâu, bò nuôi để lấy thịt hoặc cày kéo có thể sử dụng thức ăn có hàm lượng Aflatoxin cao, không dùng được cho chăn nuôi gà, lợn. Tuy nhiên đối với bò sữa lại không được phép cho ăn thức ăn nhiễm Aflatoxin, vì chúng chuyển hoá thành Aflatoxin M₁ qua sữa rất nguy hiểm đối với trẻ em và người uống sữa.

Nhiều chuyên gia ở các nước cũng khuyên nên tận dụng thức ăn và nguyên liệu thức ăn nhiễm Aflatoxin hàm lượng cao. Con đường kinh tế và tiết kiệm nhất là sự pha loãng, tức là trộn theo những tỷ lệ tính toán giữa thức ăn, nguyên liệu thức ăn nhiễm và không nhiễm Aflatoxin để đạt được những giới hạn cho phép. Người ta đã chứng minh ở lợn trong giai đoạn đầu, tức thời kỳ con vật non thường bị ảnh hưởng bởi thức ăn bị mốc, song khi phát triển ở giai đoạn vỗ béo, ảnh hưởng này sẽ không lớn và kết quả cuối cùng không có nhiều sai khác so với đối chứng (William, 1992). Nguyên nhân của hiện tượng trên được giải thích là ở giai đoạn cho ăn theo chế độ hạn chế, không cần sử dụng thức ăn hoàn toàn tốt, điều đó

có lợi về kinh tế vì giá mua nguyên liệu có tỷ lệ hạt bị mốc cao sẽ rẻ hơn giá nguyên liệu tốt. Mặt khác, quá trình chuyển hoá và hấp thụ thức ăn trong giai đoạn vỗ béo có thể cũng là nguyên nhân tạo ra sự sai khác không đáng kể giữa các lô lợn thí nghiệm.

Tóm lại, nếu hiểu rõ bản chất của nấm mốc và độc tố thì mới sử dụng có hiệu quả nguồn thức ăn hiện có. Sự hiểu biết đó sẽ tránh được những ý kiến chủ quan cho rằng, đối với vật nuôi chỉ cần sản phẩm "thừa" hoặc kém chất lượng cũng tốt rồi. Cũng cần tránh tâm lý quá sợ hãi về độc tố nấm mốc có trong thức ăn chăn nuôi mà không tận dụng nguồn thức ăn sẵn có.

Tuy nhiên sự hiểu biết đó chính là ở chỗ nên dùng thức ăn loại nào cho vật nuôi gì. Cần biết được tỷ lệ mốc là bao nhiêu phần trăm trong nguyên liệu sử dụng. Quan trọng hơn cả là xác định được hàm lượng Aflatoxin và một số các Mycotoxin khác có trong nguyên liệu là bao nhiêu.

** Có 2 phương pháp để nhận biết được sự có mặt của Aflatoxin trong nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi, chủ yếu là ngô và lạc*

1. Cần phát hiện ngô hay lạc có bị mốc không và mốc đó có phải là *Aspergillus flavus*? Điều này có thể nhận biết bằng mắt thường. Ở ngô bị mốc, nếu là loài nấm cúc vàng có thể thấy ở mầm (phôi) của hạt ngô những đám sợi màu vàng hay màu vàng lục. Nếu sợi nấm phát triển trên toàn bộ hạt ngô sẽ

làm biến đổi màu của hạt thành màu vàng xám hay xanh nhạt. Ở khô lạc thì đặc biệt là từng khối lớn sợi nấm màu vàng lục mọc trên bề mặt bánh khô lạc. Nếu lạc hạt sẽ thấy chúng trong kẽ của 2 mảnh hạt lạc, có màu vàng xám hay vàng lục.

2. Cần phân tích để xác định sự có mặt của Aflatoxin. Nhiều trường hợp do sấy khô, do rửa sạch các đám mốc bám trên bề mặt bánh khô lạc làm người ta nhầm tưởng nguyên liệu không bị mốc, điều đó có nghĩa là không có toxin. Song nhận định trên thường dẫn tới sai lầm, vì bản thân Aflatoxin không bị phân huỷ khi sấy khô hạt hoặc rửa sạch mẫu nguyên liệu bằng nước.

Có thể phát hiện định tính Aflatoxin dưới đèn tử ngoại (U.V.light) bước sóng 365nm. Nếu có màu xanh huỳnh quang có thể nghĩ là nguyên liệu bị nhiễm Aflatoxin. Tuy nhiên điều đó không hoàn toàn chính xác vì còn nhiều chất khác cũng có màu xanh huỳnh quang dưới ánh sáng tia tím.

Phát hiện định lượng Aflatoxin là bắt buộc, vì nó chính xác về chất lượng lẫn số lượng. Nếu biết hàm lượng Aflatoxin trong nguyên liệu mới có thể quyết định được nên sử dụng loại nguyên liệu đó cho vật nuôi nào, cần phối chế với các nguyên liệu tốt (đã được xác định là không có hoặc có rất ít Aflatoxin) để làm giảm hàm lượng độc tố như thế nào.

Thông thường Aflatoxin có nhiều ở các loại hạt có dầu như hạt bông, dầu lạc, ngô, đậu tương. Cám gạo, gạo và đậu

tương cũng nhiễm Aflatoxin nhưng ở mức thấp hơn. Ở các nguyên liệu khác như bột cá, bột xương, khoáng chất... ít thấy sự có mặt của Aflatoxin.

4.4. MỘT SỐ CHẾ PHẨM CHỐNG AFLATOXIN HIỆN CÓ BÁN TẠI VIỆT NAM

Hiện tại trên thị trường Việt Nam, nhiều hãng sản xuất thuốc thú y và các chế phẩm sinh học đã giới thiệu và có bán các chế phẩm chống Aflatoxin và Mycotoxin khác, có thể thấy một số chế phẩm như sau:

Biodone

Biodone là sản phẩm của ISIA pacific Pte LTD.

Theo giới thiệu của hãng sản xuất thì Biodone không hoà tan trong nước, dạng bột màu trắng; trọng lượng phân tử > 1.000.000.

Cơ chế hấp phụ Mycotoxin hay Aflatoxin dựa vào khả năng gắn kết của Aflatoxin lên bề mặt của các phân tử Biodone, bề mặt rất rộng giống như kiểu Kieselgur (hyflo supper cel) với tỷ lệ 20:80 mà hoạt lực gắn các Mycotoxin. Mycotoxin đã được gắn vào Biodone sẽ được loại ra khỏi thức ăn qua phân đào thải ra ngoài.

Liều sử dụng là 200 ppm (tức là 200g trên một tấn thức ăn). Có thể trực tiếp trộn vào thức ăn trước khi cho ăn, hoặc cho gia súc uống trực tiếp chế phẩm này.

Alvefix plus

Alvefix plus của hãng Avetra GmbH (Hà Lan) là chế phẩm chống Aflatoxin. Theo giới của hãng thì Alvefix plus bao gồm 3 thành phần:

- + Vitamin E (10.000mg)
- + Selenium (160mg dưới dạng Sodium selenite)
- + Processed silicates (Silicat đã được xử lý)

Dưới tác dụng của vitamin E có trong chế phẩm đã giúp cho gan tăng cường chức năng giải độc. Vitamin E còn ngăn cản các chất độc ảnh hưởng tới chức năng gan và bảo vệ vững chắc mạch quản.

Selenium cũng có tác dụng giống vitamin E, giúp gan bài tiết nhanh chóng độc tố ra khỏi cơ thể và trợ giúp cho quá trình phân giải Mycotoxin trong gan. Trong điều kiện thức ăn có chứa Aflatoxin, sự đòi hỏi phải tăng cường vitamin E và Selenium trong khẩu phần thức ăn.

Silicat đã chế biến: Alvefix plus có chứa nhiều thành phần khoáng chất tự nhiên khác nhau.

+ Lattice silicat có sức gắn trực tiếp hình thành một khung đặc 3 chiều.

+ Silicat lớn hình thành khung 2 chiều tạo các mối liên kết lỏng.

Khinoptilolit: gồm nhiều các Zeolite đó là Lattice calcium aluminosilicate, giàu Alkaline. Cấu trúc bề mặt rộng giữ nước và các cation để giúp cho gắn chúng trong khung kết tinh.

Klinoptilolit có thể trao đổi ion mà không làm thay đổi cấu trúc của nó. Nước đã hấp phụ có thể được thay thế bởi các chất khác kể cả các chất ưa mỡ.

Steatit là một silicat có hai lớp Magnesium giúp cho gắn kết các chất ưa mỡ.

Nontronit: Là một silicat 3 lớp Alumino, là một loại các montmorillonit giàu sắt. Có tính hấp phụ nước cao và có thể trao đổi các phân tử nước với các chất khác, thậm chí với cả dầu ăn.

Kaolinit: là một silicat 2 lớp Alumino có đặc tính giống Steatit.

Muscovite mica: là một phyllosilicat - potasium alumino có chứa magnesium, sắt, mangan, và titan.

Alvefix plus được đưa vào thức ăn nhằm giảm tác hại của các độc tố nấm mốc. Do có hoạt tính gắn chặt với các độc tố như Aflatoxin đã làm cho chúng không thể đi vào máu gây độc mà được đào thải ra ngoài theo phân. Sử dụng Alvefix plus ở hàm lượng 2 kg/tấn thức ăn cho gà dò ở 4 tuần đầu, sau đó là 1 kg/tấn thức ăn ở giai đoạn sau.

+ Đối với gà đẻ trứng liều Alvefix plus là 1 kg/tấn thức ăn.

+ Đối với lợn con là 2 kg/tấn thức ăn và sau đó là 1kg/tấn thức ở giai đoạn vỗ béo đã mang lại kết quả tốt.

Một số các chất vô cơ trong thành phần các chế phẩm hoá, lý sinh làm giảm độc tính Aflatoxin

*** *Các chất khoáng sét (Clay minerals)***

Các chất khoáng sét là các chất khoáng thứ cấp được hình thành do quá trình phong hoá của các loại silicat và đặc trưng bởi cấu trúc tầng lớp.

Chất khoáng sét 3 lớp - montinorillonite có khả năng hấp phụ cao, có tính không đặc hiệu và phụ thuộc vào thể tích của màng hợp thuỷ. Các phân tử độc chất bị hút tới màng và bị cản lại. Liên kết này không phải là cố định hoá học, chỉ là một phức hợp sáng, dựa trên cầu nối H-O-H (lực hút Van-der-vaals) ở trong màng hợp thuỷ, nó có thể mở nếu môi trường thích hợp.

Các chất khoáng sét là những chất hấp phụ rẻ tiền và có nhiều ưu điểm. Tuy nhiên chúng hút cả các vitamin và chất dinh dưỡng.

*** *Các chất khoáng Zeolit***

Zeolit là các chất khoáng thứ cấp có cấu trúc tinh thể. Có cả Zeolit thiên nhiên và tổng hợp. Trên bề mặt của Zeolit có một vật tích điện đặc biệt. Zeolit hút các phân tử nước cũng như các phân tử khác. Khả năng hút độc tố Aflatoxin của các Zeolit phụ thuộc vào nguồn gốc của chúng. Vì kích thước của các phân tử là một yếu tố quan trọng trong sự liên kết, loại Zeolit hấp phụ Aflatoxin cũng hấp phụ các phân tử dinh dưỡng có cùng kích thước.

*** Các chất trùng phân như Polyvinylpyrrolidone**

Polyvinylpyrrolidone là một homopolymer của N-vinyl-2-pyrrolidon. Là chất bột trắng mịn, có trọng lượng phân tử cao, tan trong nước và các dung môi hữu cơ.

Các chất trùng phân này có cơ chế tác dụng tương tự như clay minerals. Các thành phần polymer hút các phân tử nước, các liên kết cầu nối hydro hình thành một màng hợp thủy. Nhờ có màng này, cùng với các phân tử nước, các thành phần phân cực khác cũng bị hấp phụ.

Khả năng hấp phụ của các chất trùng phân tốt nhưng chúng có nhược điểm rất lớn là các phân tử phân cực có cùng kích thước như vitamin dễ bị hấp phụ. Những phân tử độc tố nấm không phân cực sẽ không bị hấp phụ (Wilcke J., Turner J.C., 1987).

*** Than hoạt tính.**

Là chất bột màu đen, không mùi, không vị, không tan trong nước và nhiều dung môi khác. Than hoạt tính được đốt từ gỗ, xương động vật và các vật chất hữu cơ khác. Đặc tính quan trọng nhất của than hoạt tính là có khả năng hấp phụ rất cao. Khác với một số chất hấp phụ khác, than hoạt hấp phụ tất cả các phân tử mang điện tích dương và điện tích âm (Phạm Khắc Hiếu, 1997).

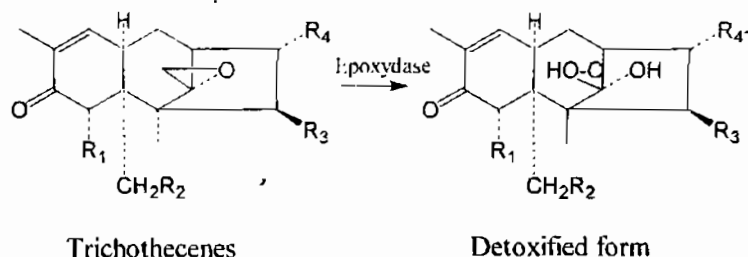
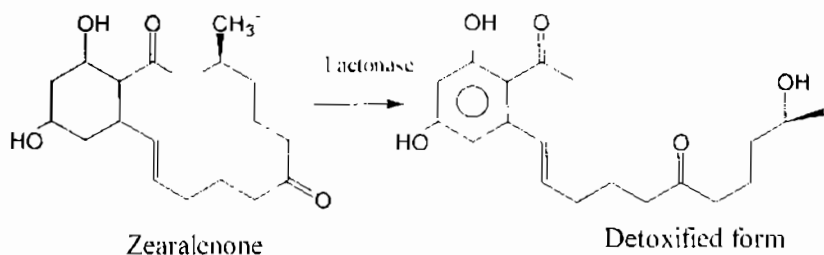
Buck và Bratich (1986) cho rằng than hoạt tính có khả năng hấp phụ nhiều loại chất độc và Aflatoxin. Cơ chế tác dụng của nó về bản chất là phủ một bề mặt tiểu phần và làm dễ quá trình đào thải chất độc qua phân.

*** Chế phẩm hoá sinh học**

Các chế phẩm hạn chế độc hại của Aflatoxin trong cơ thể tác động theo con đường sinh hoá học thường ít gây hại cho người và động vật. Một trong các chế phẩm được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi thú y hiện nay là Mycofix plus.

Chế phẩm hoá sinh học Mycofix plus do hãng Biomin (Austria) sản xuất được bổ sung vào thức ăn gia súc, gia cầm. Theo giới thiệu của hãng sản xuất thì Mycofix plus có tác dụng làm vô hoạt các độc tố nấm mốc, trong đó có Aflatoxin. Cơ chế tác dụng của Mycofix plus một mặt thông qua sự hấp phụ mycotoxin, mặt khác phá huỷ cấu trúc hoá học của mycotoxin dựa trên các men có trong chế phẩm.

Quá trình hấp phụ mycotoxin xảy ra trên màng hợp thuỷ do chất hấp phụ tạo ra. Các phân tử Aflatoxin và một số mycotoxin phân cực khác bị hút tới màng, cố định trên bề mặt màng và trở nên hoàn toàn vô hoạt. Các khoảng xúc tác trên màng hợp thuỷ điều chỉnh điện thế riêng của đa số các nhóm mycotoxin tạo nên cách hấp phụ đặc biệt của Mycofix plus. Quá trình này bắt đầu từ khoang miệng khi con vật tiết nước bọt (hoặc ngay trong thức ăn trước khi được tiêu hoá), tiếp tục ở dạ dày và ruột. Các độc tố bị cố định bởi Mycofix plus không hấp thu được vào máu. Hợp chất Mycofix plus và mycotoxin được hấp phụ cùng thải ra ngoài theo phân (Sigrid Pasteiner, 1994).



Sự phân hủy các độc tố nấm mốc nhờ men Epoxydaza và Lactonaza

Các mycotoxin không phân cực hoàn toàn bị các men có trong Mycofix plus phá hủy. Men epoxydaza phá cấu trúc của nhóm chức năng 12, 13 - epoxy (phần độc nhất của Trichothecenes).

Robert Glavits (1992) đã thử tác dụng của Mycofix plus làm vô hoạt Aflatoxin B₁ với các liều lượng 400 và 1000 ppb

Aflatoxin, 2kg Mycofix plus/1 tấn thức ăn bổ sung trong thức ăn của gà công nghiệp. Kết quả cho thấy: các lô gà cho ăn các thức ăn có bổ sung Aflatoxin B₁ đều có hiện tượng giảm tăng trọng, tăng mức tiêu tốn thức ăn. Về biến đổi bệnh lý có các hiện tượng: gan nhợt màu, thoái hoá mỡ ở gan, tăng sinh ống mật và viêm túi mật. Tác dụng của Mycofix plus làm hạn chế hiện tượng này thể hiện ở các lô gà cho ăn thức ăn bổ sung đồng thời Aflatoxin và Mycofix plus ở các liều lượng trên.

Theo nghiên cứu của Đậu Ngọc Hào và cộng sự (1995) trong phòng thí nghiệm và trên đại trà, Mycofix plus có tác dụng làm giảm ảnh hưởng xấu của Aflatoxin đối với gà thịt cũng như gà đẻ, làm cho gia cầm không có dấu hiệu bệnh lý ở gan, thận và túi mật, gà khoẻ hơn và tăng sức đề kháng với bệnh. Với hàm lượng < 2 kg/tấn thức ăn, Mycofix plus chỉ có tác dụng tốt ở liều Aflatoxin B₁ thấp (200-400 ppb). Nếu hàm lượng Aflatoxin B₁ < 100 ppb thì lượng Mycofix plus chỉ cần ≤ 1 kg/tấn thức ăn. Mycofix plus có thể được đưa vào sử dụng trong chăn nuôi nhằm phòng chống độc tố nấm mốc.

Tác dụng của 1,2 - dithiole - 3 - thione (DTT), một chất cảm ứng của enzym đơn chức năng đến quá trình hình thành các liên kết Aflatoxin - ADN trong gan chuột được Egner P.A. và cộng sự nghiên cứu năm 1990. Các liên kết ADN chính như Aflatoxin B - N7 Guanin thải theo nước tiểu chuột được cho uống DTT giảm đi rất đáng kể. Từ đó rút ra kết luận DTT là chất có thể chống lại ung thư do Aflatoxin gây ra.

Trong nhân y, chế phẩm Oltipraz được coi như một loại thuốc chống ung thư do Aflatoxin gây ra (Buetle T.M. và cộng sự, 1996).

Kết quả nghiên cứu của Firozi P.F. và cộng sự (1996) về tác dụng của chế phẩm Curcumin đến hệ thống men Cytochrom P₄₅₀ tham gia xúc tác quá trình hoạt hoá Aflatoxin B₁ cho thấy: Curcumin ức chế 50% sự hình thành các mối liên kết Aflatoxin B₁ - ADN. Nó có thể hạn chế quá trình ung thư do các chất hoá học thông qua việc điều chỉnh chức năng của cytochrom P₄₅₀.

Phạm Khắc Hiếu, Lê Thị Ngọc Diệp (1999) đã nghiên cứu tác dụng của việc hạn chế độc hại do Aflatoxin trên gà và cho biết: cao Actiso 10% liều lượng 6 ml/lít nước uống của gà có tác dụng làm giảm rõ rệt tình trạng trúng độc do Aflatoxin B₁ hàm lượng 200 và 500 ppb gây ra. Trong thịt và gan gà nhiễm độc có tác động của Actiso đã không hoặc chỉ phát hiện thấy lượng Aflatoxin B₁ tồn dư nhỏ hơn rất nhiều so với mức cho phép trong thực phẩm.

4.5. GIỚI HẠN HÀM LƯỢNG AFLATOXIN CHO PHÉP SỬ DỤNG TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI

Các tổ chức quốc tế như: Tổ chức Nông nghiệp và thực phẩm thế giới (FAO), Tổ chức Y tế thế giới (WHO), khối thị trường chung châu Âu (EU), các nước trên phạm vi thế giới

đều đưa ra những giới hạn cho phép sự có mặt của Aflatoxin trong lương thực, thực phẩm dùng cho người và gia súc.

4.5.1. Một số căn cứ để tạo lập hàm lượng giới hạn tối đa (hay giới hạn an toàn - MED)

Người ta quan tâm đến nhiễm độc Aflatoxin trong chăn nuôi không chỉ vì Aflatoxin làm thiệt hại về kinh tế cho người chăn nuôi đơn thuần mà còn do sự tồn dư của chất độc này trong sản phẩm vật nuôi, đặc biệt được chú ý đối với bò sữa. Nếu trong sữa có Aflatoxin thì rất nguy hại cho trẻ em vì cơ thể chưa trưởng thành, kể cả gia súc non và trẻ em đều rất mẫn cảm với Aflatoxin.

Người ta nghiên cứu mối tương quan giữa hàm lượng Aflatoxin có trong thức ăn của bò sữa và hàm lượng Aflatoxin trong sữa bò cho thấy nếu trong thức ăn có 100 ppb Aflatoxin B₁ thì trong sữa bò có 1,5 ppb tồn dư; 8 ppb trong sữa lợn mẹ cho con bú. Qua nhiều thí nghiệm và các kết quả phân tích khác nhau, người ta đưa ra được tỷ lệ là 100:1 (1%) giữa hàm lượng Aflatoxin trong thức ăn và trong sữa. Nhiều tác giả ở các nước khác nhau cũng đã nghiên cứu mối tương quan này trên các tổ chức như gan, thận, thịt, trứng... của vật nuôi và đưa ra kết quả tỷ lệ đó là 14.000:1 đối với thịt; 2200:1 đối với trứng; 1200:1 với gan gà; 800:1 với gan lợn và 300:1 với sữa bò. Tuy nhiên họ cũng kết luận rằng tỷ lệ trên không phải là một hằng số bởi vì sự hấp thu và thải trừ chất độc còn phụ thuộc vào cá thể con vật.

Để đảm bảo được an toàn cho vật nuôi và sức khỏe người tiêu dùng, các nhà khoa học đã tìm cách xác định giới hạn an toàn hay liều an toàn tối thiểu viết tắt theo tiếng anh là: MED (Minimum Effective Dose). Nếu nghiên cứu liều này trên gà thì phải tới 2500 ppb trong thức ăn mới gây chết ở mức có ý nghĩa ($P < 0,05$). Như vậy giới hạn an toàn phải nhỏ hơn 2500 ppb. Điều này đã đặt ra những nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của Aflatoxin tới các chức năng sinh lý và sinh hoá của vật nuôi. Ngay cả ở liều < 625 ppb thì vẫn ảnh hưởng đến hội chứng xanh tím và chảy máu ở cơ, sự giảm hàm lượng men lipaza tuyến tụy, tăng thời gian đông máu, do đó việc thiết lập giới hạn cần phải được nghiên cứu ở mức thấp hơn. 6 liều khác nhau dưới 625 ppb Aflatoxin B₁ đã được lựa chọn và rút ra hai liều là 200 và 350 ppb Aflatoxin B₁ để nghiên cứu đánh giá. Các nhà khoa học đã rút ra mối quan hệ giữa liều lượng có tác dụng và sự biến đổi sinh hoá sinh lý là tỷ lệ 10:1. Như vậy để đảm bảo an toàn về chức năng sinh lý sinh hoá thì hàm lượng đó thực chất là từ 20-35 ppb.

Tuy nhiên nếu sử dụng thuật toán thống kê để nghiên cứu nhiều yếu tố cùng một lúc với hàm lượng Aflatoxin ở các ngưỡng xác định thì thấy vẫn còn có yếu tố chưa phù hợp với sự xác định liều. Vì vậy trong mô hình nghiên cứu tiếp theo đã giảm hàm lượng từ 200-350 ppb xuống còn 50-88 ppb. Lý do còn là để không bị tách rời các yếu tố thống kê đơn thuần khỏi yếu tố sinh học của cơ thể và ngoại cảnh của gia cầm. Người ta phải mất tới 400 thí nghiệm để tính toán được sự

giảm đi 1% năng suất thực sự của vật nuôi do tác dụng của Aflatoxin. Nếu chỉ giảm đi 1% năng suất chăn nuôi do tác động của Aflatoxin thì hàng năm nước Mỹ có thể thiệt hại tới hàng trăm triệu đôla trong công nghiệp chăn nuôi gia cầm.

Như vậy làm thế nào để tránh được thiệt hại trong chăn nuôi khi đề ra những hàm lượng cho phép Aflatoxin có trong thức ăn, mà trong thực tế không thể loại bỏ hoàn toàn chất độc này. Thực sự nếu chỉ nghiên cứu trong phòng thí nghiệm hoàn toàn không đáp ứng được đòi hỏi của thực tế. Mẫu thí nghiệm đủ lớn mới phù hợp với thực tế sản xuất, khi đó phải có tới hàng nghìn gà cho một lô thí nghiệm. Và nếu có thực hiện được thì chắc chắn giới hạn đề ra phải nhỏ tới mức < 1ppb.

Do vậy cần phải có những nghiên cứu trong thực tế. Người ta đã may mắn khi chọn được tổ hợp chăn nuôi có 2 xí nghiệp sử dụng phương thức chăn nuôi giống nhau, có cùng công thức thức ăn và cùng sử dụng nguyên liệu chế biến. Kết quả cho thấy ở xí nghiệp 1 bị giảm 1% năng suất chuyển hoá thức ăn và 2% năng suất chăn nuôi so với xí nghiệp 2. Lý do được xác định là ở xí nghiệp 1 hàm lượng Aflatoxin nhiễm tới đa là 30 ppb và tần suất nhiễm là 30%, trong khi đó ở xí nghiệp 2 hàm lượng Aflatoxin là 6 ppb và tần suất nhiễm là 2%. Kết quả quan sát này được lập lại tại 6 tổ hợp chăn nuôi khác. Họ rút ra kết luận là nếu như thức ăn có chứa 6 ppb Aflatoxin B₁ và tần suất nhiễm 18% được coi như là giới hạn an toàn và thức ăn được đánh giá là tốt. Nếu hàm lượng đó là

15 ppb và tần suất nhiễm là 31% thì xem như không an toàn, thức ăn kém.

Kết hợp nhiều yếu tố trong nghiên cứu phòng thí nghiệm, các yếu tố sinh học cơ thể vật nuôi, người ta đi đến đề xuất một giới hạn MED là 10 ppb Aflatoxin B₁ đối với thức ăn của gia cầm và cũng như vậy người ta đề xuất giới hạn chất độc này cho lợn, bò và một số vật nuôi khác. Tuy nhiên cũng không thể có giới hạn nào tuyệt đối an toàn vì còn phụ thuộc rất nhiều vào yếu tố môi trường và các stress khác.

4.5.2. Hàm lượng cho phép tối đa của Aflatoxin trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi

Tài liệu tham khảo từ Stoloff (1977), Schuller (1982) và Van Egmond (1989)

Tên nước	Thực phẩm và thức ăn chăn nuôi	Hàm lượng Aflatoxin (ppb)	Ghi chú
Úc	Lạc và các sản phẩm từ lạc	15	
Áo	Tất cả các loại thức ăn chăn nuôi	50	
Bỉ	Tất cả các loại thực phẩm	5 ^a	
Braxin	Bột lạc dùng cho xuất khẩu	50 ^a	
Canada	Lạc và các sản phẩm từ lạc	15 ^b	
Colombia	Lạc	10	
Cuba	Lạc	0	
Tiệp Khắc	Lạc	5	
Đan Mạch	Lạc và các sản phẩm từ lạc	10	

Tên nước	Thực phẩm và thức ăn chăn nuôi	Hàm lượng Aflatoxin (ppb)	Ghi chú
Khối EEC (gồm Bỉ, Đan Mạch, Đức, Ailen, Ý, Luc-xăm- bua, Hà Lan, Anh, Hy Lạp, Pháp)	Thức ăn nguyên chất	50*	
	Thức ăn hỗn hợp (không dùng cho bò sữa, bê non và cừu non	50*	
	Thức ăn hỗn hợp cho các loại còn lại	10*	
	Thức ăn bổ sung (cho bò sữa)	20*	
Phần Lan	Lạc và các sản phẩm từ lạc	5	
Pháp	Tất cả các thực phẩm	10	
	Thực phẩm cho trẻ em	5	
Đức	Lạc và các sản phẩm từ lạc	5* hay 10*	
Hong Kông	Tất cả các loại thực phẩm	15	
	Lạc và sản phẩm từ lạc	20	
Ấn Độ	Lạc cho thực phẩm	60	
	Lạc cho thức ăn chăn nuôi	1000	
Ixraen	Tất cả các loại thức ăn chăn nuôi	20	(*) Không sử dụng trong thức ăn cho gà, bê hay lợn. Không dùng quá 2% cho thức ăn của bò sữa. Không quá 4% cho thức ăn các loại gia súc khác.
Ý	Lạc và các sản phẩm từ lạc	50	
Nhật	Lạc và các sản phẩm từ lạc	10*	
	Lạc dùng cho thức ăn gia súc	1000* (*)	
Kênia	Lạc và các sản phẩm từ lạc	20	
Malaysia	Toàn bộ thực phẩm	0	
Hà Lan	Lạc và các sản phẩm từ lạc	5*	

Tên nước	Thực phẩm và thức ăn chăn nuôi	Hàm lượng Aflatoxin (ppb)	Ghi chú
Niu Zilân	Tất cả các thực phẩm	15	
Philippin	Lạc và các sản phẩm từ lạc	20	Dựa trên khuyến cáo của WHO
Ba Lan	Tất cả các thực phẩm Tất cả các loại thức ăn chăn nuôi	5 ^a 0-200 ^a (*)	(*) Phụ thuộc vào loại gia súc và lượng Aflatoxin có trong bột lạc cho gia súc
Trung Quốc	Lạc	50 ^a	
Xinhhago	Lạc và các sản phẩm từ lạc, dầu ăn	10-15	
Nam Phi	Tất cả các loại thức ăn	5 ^a hay 10 ^b	
Thụy Điển	Tất cả các loại thực phẩm Lạc và các sản phẩm từ lạc	5 ^b 600 ^a (*)	(*) Giới hạn cho thức ăn bò sữa là 15%
Thụy Sĩ	Lạc và các sản phẩm từ lạc	1 ^a hay 5 ^b	
Thái Lan	Dầu ăn	20	
Anh	Lạc và các sản phẩm từ lạc	5 ^a	
Mỹ	Tất cả các loại thực phẩm và thức ăn chăn nuôi Các sản phẩm lạc cho người tiêu dùng Lạc cả vỏ Sữa, hoa quả Lạc	20 ^b 15 ^b 25 ^b 0,5 ^c 10	
Nam Tư	Các sản phẩm từ các loại hạt khác Các loại thực phẩm	5 1	
Dimbabuê	Lạc	25 ^a	

a - Aflatoxin B₁; b - Tổng số cả 4 Aflatoxin; c - Aflatoxin M₁.

Những quy định tạm thời cho phép trong thức ăn chăn nuôi và nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi ở Việt Nam
(Tài liệu của Vụ KHKT và CLSP Bộ Nông nghiệp và PTNT)

Nguyên liệu	Lượng Aflatoxin B ₁ tối đa (ppb)	Tổng số Aflatoxin B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂ (ppb)
Khô đậu lạc nhân	250	500
Khô đậu lạc cả vỏ	100	250
Ngô hạt	100	150
Sắn khô	50	100
Khô đậu tương	100	200
Đậu tương	50	100
Cám gạo	50	100
Bột cá, bột xương	10	20
Thức ăn gà con (từ 1-21 ngày tuổi)	10	30
Nhóm còn lại	30	50
Thức ăn vịt con (từ 1-21 ngày tuổi)	5	10
Nhóm còn lại	10	20
Thức ăn lợn con (từ 1-60 ngày tuổi)	20	50
Nhóm còn lại	100	200
Bò nuôi lấy sữa	20	50

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Claude Moreau (tác giả), Đặng Hồng Miên (người dịch): Nấm mốc độc trong thực phẩm (Moisissures Toxiques Dans L'Alimentation). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội, 1980.
2. Aflatoxin in Maize. A proceeding of the Workshop. El Batan, Mexico, April 7-11, 1986.
3. Edited by Thomas O. Wyllie Lawren, G. Morehouse: Mycotoxic fungi, Mycotoxin and Mycotoxicosis. An Encyclopedic Handbook.
4. Edited by Jürgen Reis: Schimmelpilze, Lebensweise Nutzen, Schaden Bekämpfung. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 1986. Berlin Heidelberg New York Tokyo.
5. Enviromental carcinogens selected methods of analysis. Volume 5 - some Mycotoxins. IARC scientific publication N^o44. International Agency for Reasearch on Cancer .Lyon, 1982.
6. Edited by V.K. Mehan, D.Mc Donald, L.J. Haravn and S. Jayanthi: The groundnut Aflatoxin problem. Review

- and Literature Database. ICRISAT Patancheru Andhra Pradesh 502324. India, 1991.
7. Entgiftung von Mycotoxinen. Physikalische Verfahren von H.M. Müller übers, Tierernährung 10 (1982) 95-122.
 8. Entgiftung von Mycotoxinen. Chemische Verfahren and Reaktion mit Inhaltsstoffen von Futtermitteln von H.M. Müller übers, Tierernährung, 11 (1983) 47-80.
 9. Diseases of swine, 7th edition. Edited by Allen D. Leman, Barbara E. Straw, William L. Mengeling, Sylvie D'Allaire and David J. Taylor. Iowa State University Press, Ames, Iowa. USA, 1992.
 10. Diseases of Poultry, 9th Edition. Edited by B.W. Calnek, H. Jahn Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid, H.W. Yoder, JR. Iowa State University Press, Ames, Iowa. USA, 1992.
 11. Mycotoxin Newslether, Australia, Volume 8, Number 1, 2, 1997. Volume 9, Number 3, 4, 1998.
 12. Postharvest Newslether - ACIAR. Number 45, 47, 1998.
 13. Aflatoxin contamination problems in Groundnut in Asia. Edited by VK Mehan, CLL Gowda. International

- Crops Research Institute for the semi-Arid Tropics - ICRISAT. Patancheru 502, 324 Andhra Pradesh, India, 1997.
14. Mycotoxins in animal Husbandry. Author: Sigrid Pastener. Printed and bound in Austria, 1994.
 15. Preventing Growth of potentially Toxic Molds using antifungal Agents. Lisa L. Ray and Uloyd B. Bullerman. Journal food protection, Vol 45, N°10, 953-962, 1982.
 16. Luận văn Tiến sĩ của Chu Văn Thanh (1998); Lê Thị Ngọc Diệp (1999); Nguyễn Hữu Nam (1999); Các bài báo đăng trong tạp chí KHKT Thú y của Đậu Ngọc Hào, (từ 1986-1999); nhiều bài báo trong và ngoài nước.

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
Lời nói đầu	3
Chương I: Nấm mốc và độc tố nấm mốc trong thức ăn và nguyên liệu thức ăn chăn nuôi	5
1.1. Nấm mốc	5
1.1.1. Khái niệm về nấm mốc	5
1.1.2. Sinh sản và phát triển	6
1.1.3. Các nhân tố ảnh hưởng đến sinh sản và phát triển của nấm mốc	8
1.2. Nấm mốc trong thức ăn và nguyên liệu thức ăn	15
1.2.1. Nấm mốc trong thực phẩm	15
1.2.2. Ảnh hưởng của nấm mốc đối với giá trị của nguyên liệu thức ăn chăn nuôi	19
1.2.3. Một số loại nấm mốc thường gặp trong nguyên liệu thức ăn và thức ăn hỗn hợp của gia súc	24
1.3. Độc tố nấm mốc và ảnh hưởng của nó với vật nuôi	34
1.3.1. Độc tố nấm mốc	34
1.3.2. Một số độc tố nấm và ảnh hưởng của chúng đối với vật nuôi	39

Chương II: Nguồn gốc, đặc tính lý, hóa, sinh học và phương pháp phân tích xác định aflatoxin	53
2.1. <i>Aspergillus flavus</i> và <i>Aspergillus parasiticus</i>	53
2.1.1. Hình thái học	53
2.1.2. Phương pháp phân biệt <i>A. flavus</i> trong nhóm <i>A. flavus oryzae</i> (Dựa theo khóa phân loại của Thom và Raper, 1945; Raper và Fennel, 1965)	55
2.1.3. Các loài nấm có khả năng sản sinh Aflatoxin	57
2.1.4. Điều kiện sản sinh Aflatoxin	58
2.2. Aflatoxin	61
2.2.1 Cấu tạo và các tính chất lý, hóa học của Aflatoxin	61
2.2.2. Phương pháp phân tích Aflatoxin	64
2.2.3. Phương pháp phân tích nhanh hàm lượng Aflatoxin trong ngô (Phương pháp BGYF)	77
2.2.4. Các bước dẫn tới sai sót trong quá trình phân tích xác định định lượng Aflatoxin	79
2.2.5. Phương pháp phân tích Aflatoxin trong tế bào động vật (Dựa theo A.O.A.C, 1982)	82

Chương III: Nhiễm độc aflatoxin	89
3.1. Sự có mặt aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi	89
3.2. Sự có mặt của aflatoxin ở ngô trước khi thu hoạch và trong quá trình bảo quản	93
3.2.1. Một số nhân tố ảnh hưởng tới sự phát triển của <i>Aspergillus flavus</i> và sản sinh Aflatoxin ở ngô trước thu hoạch	93
3.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của <i>A. flavus</i> và sản sinh Aflatoxin trong quá trình bảo quản ngô sau thu hoạch	100
3.3. Sự có mặt của aflatoxin trong thực phẩm (Aflatoxin đối với sức khỏe con người)	105
3.4. Độc tính của Aflatoxin	108
3.4.1. Độc tính và liều LD50 đối với vật nuôi	108
3.4.2. Các tổ chức mục tiêu tạo các Aflatoxin B ₁ - ADN - ADDUCTS	110
3.4.3. Chuyển hoá Aflatoxin trong cơ thể	116
3.4.4. Tính chất gây suy giảm miễn dịch	118
3.4.5. Đặc tính gây ung thư gan	120
3.4.6. Đặc điểm của ung thư gan	124
3.5. Bệnh nhiễm độc Aflatoxin ở vật nuôi (Aflatoxicosis)	127

3.5.1. Nhiễm độc Aflatoxin ở gia cầm	131
3.5.2. Nhiễm độc Aflatoxin ở lợn	136
3.5.3. Nhiễm độc Aflatoxin ở các loài vật khác	139
3.6. Ảnh hưởng của Aflatoxin đến các chỉ số sinh lý, sinh hoá và sự tồn dư độc tố trong mô bào	142
3.6.1. Ảnh hưởng của Aflatoxin B1 đến các chỉ số sinh lý và sinh hoá	142
3.6.2. Tồn dư Aflatoxin trong mô bào	145
Chương IV: Phòng chống nấm mốc và độc tố nấm mốc	148
4.1. Phương pháp phòng chống nấm mốc	148
4.1.1. Phương pháp làm khô tự nhiên	148
4.1.2. Phương pháp sử dụng hoá chất	149
4.2. Các phương pháp phân huỷ Aflatoxin	165
4.2.1. Phương pháp vật lý học	165
4.2.2. Phương pháp hoá học	173
4.2.3. Phương pháp sinh vật	180
4.3. Sử dụng thức ăn và nguyên liệu bị nhiễm Aflatoxin	182
4.4. Một số chế phẩm chống Aflatoxin hiện có bán tại Việt Nam	187
	209

4.5. Giới hạn hàm lượng Aflatoxin cho phép sử dụng trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi	195
4.5.1. Một số căn cứ để tạo lập hàm lượng giới hạn tối đa (hay giới hạn an toàn - MED)	196
4.5.2. Hàm lượng cho phép tối đa của Aflatoxin trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi	199

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

D14 Phương Mai, Đống Đa, Hà Nội

ĐT : 8523887 – 8524501 – 8521940

FAX : (04) 5760748

CHI NHÁNH NXB NÔNG NGHIỆP

58 Nguyễn Bình Khiêm, Quận 1, TP Hồ Chí Minh

ĐT : 8297157 – 8294521

FAX: (08) 9101036

Chịu trách nhiệm xuất bản
NGUYỄN CAO DOANH

Biên tập và sửa bản in
BÍCH HOA - HOÀI ANH

Trình bày, bìa
PHAN HUY

In 1000 bản, khổ 14,5 × 20,5 cm. Chế bản và in tại X.I NXBNN.
Giấy chấp nhận đăng ký KHXB số 499/121 do CXB cấp ngày
28/1/2003. In xong và nộp lưu chiểu quý IV/2003.

63 - 630

NN - 03

499/121 - 03

Giá : 22.000 đ