

FUSARIUM SPECIES AND ZEARALENONE – CONTAMINANTS OF BROILER CHICKEN FEED

M. Škrinjar¹, Zoranka Grbić² and Jovanka Popov-Raljić²

¹ University of Novi Sad, Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, and

² Agroživ-Yuko, Žitište, Yugoslavia

ВИДОТ FUSARIUM И ЗЕАРАЛЕНОН - КОНТАМИНАНТИ НА ХРАНАТА ЗА БРОЈЛЕРИТЕ

М. Шкрињар¹, Зоранка Грбић² и Јованка Појов-Раљкић¹

¹ Новосадски Универзитет, Технолошки факултет, 21000 Нови Сад,

² Агрожив-Јуко, Житиште, Југославија

SUMMARY

The infection of broiler chicken feed (starter, finisher I and II) with *Fusarium* species and zearalenone (ZEA) was investigated during feeding. Samples were taken from a farm in Vojvodina on the first day when 1-day old chickens were placed in the object, and after 11, 21, 32, 42 and 49 days of feeding.

The total number of moulds in 1 g was determined using the standard Koch's method, and the identification of *Fusarium* species was performed according to Nelson et al. (1983). The qualitative and quantitative determination of ZEA was performed by method described by Balzer et al. (1978).

The total number of moulds per 1 g was in the range from 2.0×10^4 (finisher I) to 4.0×10^5 (starter). Moulds from *Fusarium* genus were dominant in the isolated mycopopulations. The following species were isolated: *F. lateritium* Nees, *F. moniliforme* Sheldon, *F. solani* (Mart.) Appel & Wollenw. emend. Snyder & Hans, *F. sporotrichioides* Sherb. and *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas. All species cited are known to be the producers of ZEA. The most frequent species was *F. moniliforme*, isolated from 67% of samples.

Not one feed sample was proved to contain ZEA.

Further, the possibility of ZEA production was investigated in laboratory conditions using 4 isolates of *F. moniliforme* and 1 isolate of *F. lateritium*, *F. solani*, *F. sporotrichioides* and *F. subglutinans*. The chosen isolates were grown on ground and sterilized wheat grain (25 g) at 26 to 28°C for 14 days, after that toxins were extracted.

КРАТКА СОДРЖИНА

Заразувањето на храната за бројлерите (стартер, финишер I и II) со родот *Fusarium* и зеараленон (ЗЕА) беше испитано за време на хранењето. Примероци беа земени од една фарма во Војводина првиот ден кога пилињата стари еден ден беа сместени во објектот и по 11, 21, 32, 42 и 49 дена хранење.

Вкупниот број на мувли во 1 грам беше одреден со употреба на стандардниот Кохов метод, а идентификацијата на родот *Fusarium* беше извршена според Нелсон и други (1983). Квалитативното и квантитативното одредување на ЗЕА беше извршено со помош на методот опишан од страна на Балзер и други (1978).

Вкупниот број на мувли во 1 грам се движеше од 2.0×10^4 (финишер I) до 4.0×10^5 (стартер). Мувлите од родот *Fusarium* беа доминантни во изолираните микропопулации. Следните видови беа изолирани *F. lateritium* Nees, *F. moniliforme* Sheldon, *F. solani* (Mart.) Appel & Wollenw. emend. Snyder & Hans, *F. sporotrichioides* Sherb. and *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas. Сите наведени видови се познати како создавачи на ЗЕА. Најчестиот вид беше *F. moniliforme* кој беше изолиран во 67% од примероците.

Ниту еден примерокот од храната не содржеше ЗЕА.

Понатаму, беше истражена можноста за создавање на ЗЕА во лабораториски услови со употреба на 4 изолати на *F. moniliforme* и по еден изолат на *F. lateritium*, *F. solani*, *F. sporotrichioides* and *F. sub-*

Only two isolates of *F. moniliforme* synthesized ZEA at concentrations 1.140,00 and 1.260,00 µg/kg, as well as one isolate of *F. solani* (820,00 µg/kg).

Key words: brojyer's chicken feed, contamination, *Fusarium* spp., zearalenone

INTRODUCTION

Chicken feed which is used from the first day of life, till the end of fattening, contains different components, depending on the age of chicks. The main components are corn, wheat, soybean grits and middling, though the portion of other components (soybean meal, sunflower meal, yeast etc.) is not insignificant. All these components are very often contaminated by moulds and may be the source of finished feed contamination by mycotoxins.

Regarding the contaminants, the most important are the species from genera *Aspergillus*, *penicillium* and *Fusarium*. Most of these species are toxigenic (Singh et al., 1991). A special importance is attached to *Fusarium* species which can infect the wheat, in periods of vegetation and ripening, but later also, during storage. They synthesize different mycotoxins, the most important ones are trihothecenes and zearalenone.

Chickens are rather weak to the influence of mycotoxins, and from that aspect may be classified in the group of animals sensitive to the effect of certain fungal toxic metabolites. The effects provoked by zearalenone are different and depend on the concentration taken with feed, age and sex of animal, kind of animal and their resistance. Zearalenone and its derivatives are uterotropically active. In sexually immature animals they provoke estrus, similar to the effect of estrogenic hormones on adult, sexually mature animals (Christensen, 1979). Due to the influence of zearalenone, the growth of animals decreases and the percentage of feed/meat conversion is low.

Having this in mind, the aim of this work was to investigate the contamination of chicken feed during fattening by *Fusarium* species, their share in the isolated mycopopulations, as well as the possible presence of zearalenone. A special attention has been paid to the formation of zearalenone by chosen *Fusarium* species in laboratory conditions.

MATERIALS AND METHODS

Mycological and mycotoxicological analyses included chicken feed (starter, finisher I and II), immediately before the consumption. Samples were taken at a public chicken farm at Vojvodina region, on the first day when 1-day old chicken were placed into the object, and on the 11th, 21st, 32nd, 42nd and 49th day of chicken fattening.

At the end of the experiment, the average weight of chickens, "Hybro" race, was 2.075 g. Feed conversion

glutinans. Избраните изолати беа одгледувани 14 дена на смелени и стерилизирани зрна пченица (25 g) на 26 до 28°C, а после тоа беше извршена екстракција на токсините.

Само два изолата на *F. moniliforme* синтетизираа ЗЕА во концентрации од 1.140,00 и 1.260,00 µg/kg, како и еден изолат на *F. solani* (820,00 µg/kg).

Клучни зборови: храна за бројлери, контаминација, *Fusarium* spp., зearаленон

ВОВЕД

Храната за пилињата која се користи од првиот ден на животот до крајот на товењето содржи различни состојки во зависност од возраста на пилињата. Главните состојки се пченка, пченица, гриз и крупица од соја, иако и делот на останатите состојки (брашно од соја, брашно од сончоглед, квасец итн.) не е незначителен. Сите овие состојки се многу често контаминирани од мувла и можат да бидат извор на контаминација на готовата храна со микотоксини.

Во однос на контаминантите, најважни се видовите од родовите *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Најголемиот дел од овие видови се токсиногени (Синг и други, 1991). Посебна важност му се придава на видот *Fusarium* кој може да ја инфицира пченицата во периодите на вегетација и зреење, но исто така и подоцна за време на складирањето. Тие синтетизираат различни микотоксини, од кои најважни се trihothecenes и зearаленон.

Пилињата се доста неотпорни на влијанието на микотоксините и од тој аспект се класифицираат во групата животни осетливи на ефектите на одредени габни токсични метаболити. Ефектите предизвикани од зearаленон се различни и зависат од концентрацијата внесена преку храната, возраста и полот на животното, видот на животното и нивната отпорност. Зearаленон и нејзините деривати се утеротропикално активни. Кај сексуално незрелите животни тие предизвикуваат еструс слично на ефектите кои ги имаат естрогенските хормони врз возрасните сексуално зрели животни (Кристensen, 1979). Заради влијанието на зearаленон, растото на животните се намалува и процентот на конверзијата храна/месо е низок.

Имајќи го ова в предвид, целта на оваа студија беше да се испита контаминацијата на храната за пилиња со видот *Fusarium* за време на товењето, нивниот удел во изолираните популации, како и можното присуство на зearаленон. Посебно внимание се посвети на формирањето на zearalenon со избрани видови *Fusarium* во лабораториски услови.

(feed consumption/kg of growth) was 2,52 g, daily growth 37,52 g, and the average percentage of death was 9,08. The chicken were fed starter, finisher I and finisher II for 20, 27 and 8 days, respectively.

The starter contained the following components: corn (33,57 %), wheat (20,00 %), soybean grits (16,91 %), middling (10,00 %), fish meal (8,50 %), sunflower meal - 44% (5,00 %), yeast (2,00 %), dicalcium phosphate (1,71 %), premix (1,00 %), limestone (0,81 %), salt (0,25 %), soybean oil (0,16 %), stimulator (0,05 %), and methionin (0,03 %).

Finisher I included the following components: corn (37,80 %), wheat (20,00 %), soybean grits (18,14 %), middling (10,00 %), fish meal (5,00 %), soybean meal (4,97 %), dicalcium phosphate (1,96 %), premix (1,00 %), limestone (0,71 %), salt (0,25 %), stimulator (0,05 %), and methionin (0,12 %).

The composition of finisher II was: corn (35,92 %), wheat (15,00 %), soybean grits (21,97 %), middling (15,00 %), fish meal (3,00 %), soybean meal (2,75 %), dicalcium phosphate (2,19 %), sunflower meal - 44% (2,05 %), limestone (0,75 %), salt (0,30 %) and methionin (0,12 %).

Mycological analyses. Samples and quantification of total viable counts of moulds per 1 g of feed sample were carried out by using the standard Koch's method. inoculated Petri dishes with Sabouraud dextrose agar (SDA) containing streptomycin (0,01 %) were incubated for 7 days at 25°C. After that, moulds which belong to the genus *Fusarium* were transferred on potato dextrose agar (PDA) for further identification. Determination of *Fusarium* species was performed according to Nelson et al. (1983).

Mycotoxicological analyses. Quantitative and qualitative determination of zearalenone was performed by thin-layer chromatographic method described by Balzer et al. (1978).

Production of zearalenone in pure culture. During further experiments the possibility of zearalenone production by four isolates of *F. moniliforme* and one isolate of *F. lateritium*, *F. solani*, *F. sporotrichioides* and *F. subglutinans* under laboratory conditions was investigated. Ground and sterilized wheat kernels (25 g) were inoculated with 5 ml of inoculum of test microorganisms (10⁶/ml of vegetative cells). Erlenmayer flasks (300 ml) with inoculated medium were incubated at 26 to 28°C for 14 days. During the 2nd and 3rd day 5 ml of sterile distilled water was added into the medium. Extraction of zearalenone and its determination were carried out by the above mentioned procedure.

Experiments were performed in triplicates.

RESULTS AND DISCUSSION

As can be noticed from Table 1, moulds were isolated from all tested samples of broiler's chicken feed

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Миколошките и микотоксиколошките анализи ја земаа храната за пилиња (стартер, финишер I и II) веднаш пред консумирањето. Примероци беа земени од една јавна пилешка фарма во Војводинскиот регион на првиот ден кога пилињата стари еден ден беа сместени во објектот и исто така на 11, 21, 32, 42 и 49 ден од тогов на пилињата.

На крајот на експериментот, просечната тежина на пилињата, "Хибро" раса, беше 2.075 g. Конверзијата на храната (потрошувачка на храна/ kg раст) беше 2,52 g, дневен раст 37,52 g, а просечниот процент на смртност беше 9,08. Пилињата беа хранети со стартер, финишер I и II последователно 20, 27 и 8 дена.

Стартерот ги содржеше следните состојки : пченка (33,57 %), пченица (20,00 %), гриз од соја (16,91 %), крупица (10,00 %), рибино брашно (8,50 %), сончогледово брашно - 44% (5,00 %), квасец (2,00 %), дикалциум фосфат (1,71 %), претсмеса (1,00 %), камен варовник (0,81 %), сол (0,25 %), зејтин од соја (0,16 %), стимулатор (0,05 %), и метионин (0,03 %).

Финишерот I ги содржеше следните состојки: пченка (37,80 %), пченица (20,00 %), гриз од соја (18,14 %), крупица (10,00 %), рибино брашно (5,00 %), соино брашно (4,97 %), дикалциум фосфат (1,96 %), претсмеса (1,00 %), камен варовник (0,71 %), сол (0,25 %), стимулатор (0,05 %), и метионин (0,12 %).

Составот на финишер II беше : пченка (35,92 %), пченица (15,00 %), гриз од соја (21,97 %), крупица (15,00 %), рибино брашно (3,00 %), соино брашно (2,75 %), дикалциум фосфат (2,19 %), сончогледово брашно - 44% (2,05 %), камен варовник (0,75 %), сол (0,30 %) и метионин (0,12 %).

Миколошка анализа. Беа извршени земање примероци и квантификација на вкупниот број на мувли одржливи во живот на 1 g примерок од храна со употреба на стандардниот Кохов метод. Петријеви чинии со Сабурдоово гоилиште (SDA) кое содржи стрептомицин (0,01 %) беа инкубирани 7 дена на 25°C. После тоа, мувлите кои припаѓаат на родот *Fusarium* беа пренесени на компирово гоилиште (PDA) за понатамошна идентификација. Одредувањето на видот *Fusarium* беше изведено според Нелсон и други (1983).

Микотоксиколошка анализа. Квантитативното и квалитативното одредување на зеараленон беше извршено со тенкослојниот хроматографски метод опишан од Балзер и други (1978).

Производство на зеараленон во чисти култури. За време на понатамошните експерименти беше испитувана можноста за производство на

(starter, finisher I and II). Their total viable counts per 1 g ranged from 2.0×10^4 (finisher I) to 3.3×10^5 (starter).

Table 1. Total viable counts of moulds in broiler's chicken feed

Feed	Sampling (day)	Total viable counts of moulds per g
Starter	1st	1.4×10^5
Starter	11th	3.3×10^5
Finisher I	21st	2.0×10^4
Finisher I	32nd	1.2×10^5
Finisher I	42nd	1.1×10^5
Finisher II	49th	7.0×10^4

Fusarium species were the most dominant fungi in mycopopulations isolated from feed samples. Beside *Fusarium* spp., moulds belonging to genera *Botrytis*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* and *Penicillium* were also isolated. But, compared to the frequency of *Fusarium* species, these fungi appeared rarely.

Five species of genus *Fusarium* were isolated: *F. lateritium* Nees, *F. moniliforme* Sheldon, *F. solani* (Mart.) Appel & Wollenw. emend. Snyd. & Hans, *F. sporotrichioides* Sherb. and *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas (Table 2). These species belong to the various section of genus *Fusarium* (Table 3). They are characterized by high frequency of occurrence in the environment. *F. moniliforme* was the most frequent *Fusarium* species isolated from about 67% of feed samples. It produces various toxic metabolites, including diacetoxyscirpenol, fusaric acid, furanoterpenoids, moniliformin, zearalenone and T-2 toxin (Marasas et al., 1984).

Table 2. *Fusarium* species isolated from broiler's chicken feed

Feed	Sampling (day)	<i>Fusarium</i> species
Starter	1st	<i>F. moniliforme</i>
Starter	11th	<i>F. moniliforme</i> <i>F. solani</i>
Finisher I	21st	<i>F. moniliforme</i> <i>F. sporotrichioides</i>
Finisher I	32nd	<i>F. subglutinans</i>
Finisher I	42nd	<i>F. moniliforme</i>
Finisher II	49th	<i>F. lateritium</i>

zearalenon од четири изолати на *F. moniliforme* и еден изолат на *F. lateritium*, *F. solani*, *F. sporotrichioides* и *F. subglutinans* во лабораториски услови. Смелени и стерилизирани семки од пченица (25 g) беа инокулирани со 5 ml тест микроорганизми (10^6 /ml вегетативни клетки). Ерленмајерови шишиња (300 ml) со вакцинирана подлога беа инкубирани 14 дена на 26 до 28°C. За време на вториот и третиот ден 5 ml стерилна дестилирана вода беа додадени во подлогата. Екстракцијата на зearalenon и неговото одредување беа извршени со гореспоменатата постапка.

Експериментите беа извршени тројно.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИИ

Како што може да се види од Табела 1, мувлите беа изолирани од сите тестирани примероци на храна за бројлерите (стартер, финишер I и II). Нивните вкупни бројки на одржливи во живот на 1 g се движеа од 2.0×10^4 (финишер I) до 3.3×10^5 (стартер).

Fusarium видовите беа најдоминантни габи во микопопулациите изолирани од примероците на храна. Освен *Fusarium* spp., мувли кои припаѓаа на родовите *Botrytis*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Penicillium* беа исто така изолирани. Но во споредба со честоста на видовите *Fusarium*, овие габи ретко се појавуваа.

Пет вида од родот *Fusarium* беа изолирани: *F. lateritium* Nees, *F. moniliforme* Sheldon, *F. solani* (Mart.) Appel & Wollenw. emend. Snyd. & Hans, *F. sporotrichioides* Sherb. и *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas (Табела 2). Овие видови припаѓаат на различните оддели на родот *Fusarium* (Табела 3). Тие се карактеризираат со висока честост на појавување во животната средина. *F. moniliforme* беше најчестиот *Fusarium* вид изолиран од околу 67% од примероците на храна. Тој создава најразлични токсични метаболити, како што се диацетоксисцирпенол, фусарична киселина, фуранотерпеноиди, монилиформин, zearalenon и T-2 токсин (Марасас и други, 1984).

Другите видови *Fusarium*, изолирани за време на овие испитувања се исто така токсиногени. При одредени услови тие можат да произведуваат некои микотоксини. Зearalenon е еден од нив.

Во лабораториски услови, како што беше утврдено, два *F. moniliforme* изолати (бр. 1 и 3) произведоа zearalenon во концентрации од 1140,00 и 1260,00 µg/kg како и еден изолат од *F. solani* (820,00 µg/kg) (Табела 4).

Table 3. *Fusarium* sections

Section	<i>Fusarium</i> species
Sporotrichiella	<i>F. sporotrichioides</i>
Lateritium	<i>F. lateritium</i>
Liseola	<i>F. moniliforme</i> <i>F. subglutinans</i>
Martiella and Ventricosum	<i>F. solani</i>

The other *Fusarium* species, isolated throughout these investigations, are toxigenic too. Under certain conditions they can produce some mycotoxins. Zearalenone is one of them.

In laboratory conditions, as it was established, two *F. moniliforme* isolates (no. 1 and 3) produced

zearalenone at concentrations of 1140,00 and 1260,00 µg/kg as well as one isolate of *F. solani* (820,00 µg/kg) (Table 4).

Table 4. Concentrations of zearalenone produces by *Fusarium* species cultivated in pure cultures

Isolate	Concentration of zearalenone µg • kg ⁻¹
<i>F. moniliforme</i> 1	1.140,00
<i>F. moniliforme</i> 2	- ^a
<i>F. moniliforme</i> 3	1.260,00
<i>F. moniliforme</i> 4	-
<i>F. lateritium</i>	-
<i>F. solani</i>	820,00
<i>F. sporotrichioides</i>	-
<i>F. subglutinans</i>	-

^a not detected

REFERENCES

1. Balzer, I., Bogdanić, Č. and Pepeljnjak, S. 1978. Rapid thin-layer chromatographic method for determining aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 6, 584-585.
2. Bočarov-Stančić, A. 1996. Uticaj ekoloških i drugih faktora na rasprostranjenost plesni i mikotoksina u žitaricama i mogućnost njihove dekontaminacije. PhD Thesis, University of Novi Sad, Faculty of Technology - Faculty of Agriculture, x + 140 pp.
3. Christensen, C.M. 1979. Zearalenone. Conference on mycotoxins in animal feeds and grains related to animal health, Rockville, Maryland, June 8, Proc. p. 1 - 79.
4. Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species. Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, xix + 328 pp.
5. Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, xix + 328 pp.
6. Singh, K., Frisvad, J.C., Thrane, U. and Mathur, S.B. 1991. An Illustrated Manual on Identification of some Seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their Mycotoxins. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, DK-2900 Hellerup, Denmark, 132 pp.