

PRISUSTVO POTENCIJALNO TOKSIGENIH GLJIVA U HRANI ZA ŽIVOTINJE SA POSEBNIM OSVRTOM NA VRSTE RODOVA *Aspergillus* I *Fusarium***

V. Krnjaja^{1*}, J. Lević², Z. Tomić¹, Lj. Stojanović¹, S. Trenkovski¹, Z. Nešić¹, G. Marinkov¹

¹ Institut za stočarstvo, Beograd-Zemun, 11080, Zemun, Republika Srbija

² Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd-Zemun, 11080, Republika Srbija

Corresponding author:

*Vesna Krnjaja, e-mail: vkrnjaja@mail.com; vkrnjaja@yahoo.com

**Originalan naučni rad - original scientific paper

Rad finansira Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Projekat TR. 6826

Apstrakt: Ukupno 72 uzoraka različitih vrsta hrane za životinje ispitano je na prisustvo potencijalno toksigenih rodova gljiva. Izolovano i identifikovano je ukupno pet rodova gljiva sa sledećim stepenom zastupljenosti: *Aspergillus* (79,17%), *Rhizopus* (70,83%), *Penicillium* (68,06%), *Fusarium* (51,39%) i *Mucor* (30,56%). Najčešće izolovane vrste iz rodova *Aspergillus* i *Fusarium* su: *A. flavus* (73,61%), *A. fumigatus* (31,94%), *A. ochraceus* (23,16%), *A. niger* (4,17%), *F. verticillioides* (36,11%), *F. proliferatum* (15,28%) i *F. subglutinans* (2,78%).

Cljučne reči: hrana za životinje, ukupan broj gljiva (plesni), toksigene vrste, *Aspergillus* spp. i *Fusarium* spp.

Uvod

Kvalitet hrane za životinje je važan preduslov za postizanje optimalnih proizvodnih rezultata, kao i očuvanje zdravstvenog stanja životinja, posebno u intenzivnoj industrijskoj proizvodnji, pa je neophodno stalno kontrolisati sirovine i gotove krmne smeše.

Prisustvo različitih rodova gljiva (plesni) u hrani za životinje je prirodna pojava a ne izuzetak. Putevi kontaminacije hrane za životinje gljivama i njihovim mikotoksinima su različiti, počev od kontaminiranosti sirovina (npr.

kukuruza kao najčešće komponente) koje ulaze u sastav hrane za životinje već u polju, tokom berbe i transporta, zavisno od načina skladištenja sirovina i gotovih proizvoda, kao i procesa proizvodnje i manipulacije hranom za životinje (Lević i Stojkov, 2002; Harley, 1997; Nelson i sar., 1993; Joffe, 1983).

Pojava raznovrsne mikroflore u hrani za životinje znak je povećane aktivnosti mikroorganizama i prisustva raznih produkata metabolizma, od kojih su najštetniji mikotoksini. Po pravilu, u usitnjenom supstratu, kao što su krmne smeše, brži je razvoj gljiva, posebno ako su nepovoljni uslovi čuvanja, čime je i veća mogućnost njihove kontaminacije mikotoksinima. Veći broj gljiva je utvrđen na polomljenim zrnima ili u nečistoćama koje se nalaze sa zrnima. Tako, na primer, Crnojević i sar. (1980) su ustanovili da 1 g uzorka neoštećenog zrna kukuruza sadrži do 13.000 gljiva a 1 g oštećenog 430.000. Ovi autori navode da se sa povećanjem udela oštećenog i kontaminiranog kukuruza gljivama u krmnoj smeši smanjuje prosečan dnevni prirast svinja, povećava se utrošak hrane za 1 kg prirasta i produžava se vreme tova, a sve to dovodi do povećanja troškova i smanjenja ekonomčnosti proizvodnje svinja.

Prisustvo gljiva, međutim, nije uvek indikacija i prisustva mikotoksina, odnosno da su one toksigene. Tako su npr., Dilas i sar. (2001) u 1999. godini ustanovili da, iako su smeše za svinje, živinu i goveda bile mikrobiološki neispravne zbog prisustva gljiva iz rodova *Fusarium* (58%), *Penicillium* (46%) i *Aspergillus* (43%) smeše nisu sadržavale ni jedan analiziran mikotoksin (aflatoksin B1, B2, G1 i G2, ohratoksin A, zearalenon i trihotecene). Do sličnih rezultata su došli Škrinjar i sar. (1995) proučavajući sastav gljiva i sadržaja njihovih sekundarnih metabolita (mikotoksina) u hrani za piliće.

Prisustvo mikotoksina u hrani za životinje prouzrokuje oboljenja (mikotoksikoze) kod životinja i ljudi (Bhat i sar., 1989; Ueno, 1983; Lončarević i sar., 1972). Mikotoksikoze mogu da budu sa fatalnim posledicama u vidu direktnih gubitaka zbog uginjavanja životinja. Indirektne štete mikotoksikoza su smanjenje proizvodnih i reproduktivnih sposobnosti domaćih životinja koje daje nezadovoljavajuće ekonomske rezultate proizvodnje.

Zbog štetnog uticaja mikotoksina, producenata gljiva, u hrani za životinje u radu je ispitivano prisustvo ukupnog broja gljiva (plesni) i potencijalno toksigenih rodova gljiva s posebnim osvrtom na vrste rodova *Aspergillus* i *Fusarium*.

Materijal i metod rada

U radu je ispitivano 72 uzoraka različitih vrsta hrane za životinje na prisustvo ukupnih gljiva (plesni) i potencijalno toksigenih vrsta gljiva iz rodova *Aspergillus* i *Fusarium*. Uzorci su ispitivani tokom 2005. i 2006. godine u akreditovanoj Mikrobiološkoj laboratoriji Instituta za stočarstvo, Beograd-Zemun, a poreklom su sa teritorije Republike Srbije. Ispitivanje je vršeno

standardnim mikrobiološkim metodama, prema važećim propisima o higijenskoj ispravnosti hrane za životinje. Ukupan broj gljiva utvrđen je zasejavanjem uzoraka na podlogu za ukupan broj bakterija, kojom se određuje i ukupan broj gljiva. Izolacija posebnih rodova gljiva vršena je zasejavanjem uzoraka na selektivnu podlogu za gljive (plesni), Sabouraud dekstrozni agar.

Na osnovu makroskopskih (opšti izgled kolonije) i mikroskopskih odlika čistih kultura dobijenih izolata iz analiziranih uzoraka hrane (prisustvo ili odsustvo mikrokonidija, oblik i način formiranja mikrokonidija i konidiogenih ćelija, izgled makrokonidija, prisustvo ili odsustvo hlamidospora) izvršena je identifikacija vrsta roda *Fusarium* (Nelson i sar., 1983; Burgess i sar., 1994). Vrste iz roda *Aspergillus* identifikovane su na osnovu morfoloških karakteristika koje je opisao Mihajlović (1983).

Rezultati istraživanja i diskusija

Ukupan broj gljiva je jedan od kriterijuma u oceni higijenskog kvaliteta i vrlo je značajan za orijentaciju u većoj i maloj verovatnoći da hrana sadrži mikotoksine. Prema uslovima propisanim u članu 8 i 9 Pravilnika o maksimalnim kolčinama štetnih materija i sastojaka u stočnoj hrani (Sl. list SRJ 2/90), smeše i sirovine za hranu za životinje ne odgovaraju po higijenskom kvalitetu ako sadrže više od 300.000 gljiva (plesni) u 1 g krmne smeše za starije životinje ili 50.000 za mlade životinje.

Analizom ispitivanih uzoraka hrane za životinje ustanovljeno je da broj gljiva po 1 g varira od 1000 do 4.500.000 (tabela 1). Ovaj maksimalni broj gljiva u ispitivanim uzorcima uslovljen je prisustvom velikog broja kvasaca. Najveći broj uzoraka sadržavao je ukupan broj gljiva u koncentraciji $1-6 \times 10^4$ (40,28%).

Tabela 1. Stepen kontaminacije ispitivanih uzoraka hrane za životinje gljivama
Table 1. Level of contamination of investigated samples of animal feed with fungi

Stepen kontaminacije /g uzorka Level of contamination /g of sample	Broj uzoraka No. of samples	Procenat uzoraka Percentage of samples
$4,3-4,5 \times 10^6$	72/2	2,78
$1-9 \times 10^5$	72/19	26,39
$1-6 \times 10^4$	72/29	40,28
$1-2 \times 10^3$	72/22	30,56

Primenom propisanih kriterijuma (Sl. list SRJ 2/90) na 72 uzoraka hrane za životinje koji su prikupljeni u 2005. i 2006. godini, utvrđeno je da nije mikrobiološki ispravno 6,94% uzoraka hrane za mlade kategorije životinja i 15,28% uzoraka hrane za starije kategorije životinja, dok je 77,78% uzoraka

hrane za obe navedene kategorije životinja imalo zadovoljavajuću mikrobiološku ispravnost (tabela 2).

Tabela 2. Broj i procenat ispitivanih uzoraka hrane za životinje sa ukupnim brojem gljiva na graničnom broju prema Pravilniku
Table 2. Number and percentage of investigated samples of animal feed with total number of fungi within limit values according to Regulation

Ukupan broj gljiva Total number of fungi	Broj uzoraka No. of samples	Procenat uzoraka Percentage of samples
> 50.000 ^a	72/5	6,94
> 300. 000 ^b	72/11	15,28
Ispod graničnih vrednosti ^c - Bellow limit values ^c	72/56	77,78

^a – ukupan broj gljiva koji ne odgovara uslovima Pravilnika za mlade kategorije životinja – total number of fungi which is not in accordance with Regulation for category of young animal

^b – ukupan broj gljiva koji ne odgovara uslovima Pravilnika za starije kategorije životinja – total number of fungi which is not in accordance with Regulation for category of adult animals

^c – ukupan broj gljiva koji odgovara uslovima Pravilnika za obe navedene kategorije životinja – total number of fungi which is in accordance with Regulation for both mentioned animal categories

Rezultati ispitivanja hrane za životinje namenjene za ishranu živine i svinja, koje su *Marković i sar.* (2005) dobili za period 1995-2004. godina, pokazuju da su smeše za mlade životinje sadržale od 100 do 3.400.000 gljiva/g, pri čemu je čak 35,71% uzoraka sadržavalo nedozvoljen broj gljiva. Prema ovim autorima, smeše za odrasle životinje sadržale su od 800 do 8.000.000 gljiva/g, pri čemu je 7,54% uzoraka bilo mikrobiološki neispravno.

Osim određivanja ukupnog broja gljiva mikrobiološkom analizom svih ispitivanih uzoraka hrane za životinje, izolovano je i identifikovano pet rodova gljiva: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* i *Rhizopus*. U većini ispitivanih uzoraka identifikovano je više od jedne vrste gljiva iz rodova *Aspergillus* i *Fusarium*, dok je u manjem broju uzoraka identifikovana samo po jedna ili nijedna od ovih vrsta gljiva.

U ispitivanim uzorcima hrane za životinje najzastupljenije su gljive iz rodova *Aspergillus* (79,17%), zatim slede rodovi *Rhizopus* (70,83%), *Penicillium* (68,06%), *Fusarium* (51,39%) i *Mucor* (30, 56%) (tabela 3). Kod većine uzoraka identifikovano je više od jednog roda gljiva. Slčne rezultate o zastupljenosti pojedinih rodova gljiva u hrani za životinje navode i drugi autori, a najčešće su to rodovi *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (*Sweeney i Dobson*, 1998; *Šefer i sar.*, 1998). *Marković i sar.* (2005) su u ispitivanim uzorcima hrane namenjene za živinu i svinje ustanovili najveće prisustvo *Penicillium* spp. (28,38), zatim slede *Aspergillus* spp. (26,37%), *Mucor* spp. (24,67%), *Fusarium*

spp. (11,33%) i *Rhizopus* spp. (9,22%). Prema ovim autorima znatno manje je učešće vrsta roda *Fusarium* u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

Mrđen i sar. (1990) su ustanovili da zbog prisustva gljiva (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i dr.) nisu mikrobiološki bila ispravna 22,7% uzorka krmne smeše, 10,8% uzoraka komponenti biljnog porekla (kukuruz, ječam, sačma), prikupljenih uglavnom u regionu Vojvodina, i 1,8% uzoraka komponenti animalnog porekla, uglavnom iz uvoza. Zbog prisustva vrsta iz rodova *Aspergillus* (78,3%), *Penicillium* (58,7%) i *Fusarium* (43,5%), *Mašić i sar.* (2002) su ustanovili da je u 2001. godini bilo neispravno 43,5-48,1% smeša za svinje i 14,0-17,2% smeša za početni i završni tov svinja, suprasne i dojne krmače.

Tabela 3. Procentualna zastupljenost rodova gljiva u ispitivanim uzorcima hrane za životinje
Table 3. Frequency in percentages of fungi genera in investigation samples of animal feed

Rod gljive - Genus of fungus	Zastupljenost (%) - Frequency (%)
<i>Aspergillus</i>	79,17
<i>Rhizopus</i>	70,83
<i>Penicillium</i>	68,06
<i>Fusarium</i>	51,39
<i>Mucor</i>	30,56

Među identifikovanim vrstama gljiva iz roda *Aspergillus* u ispitivanim uzorcima hrane za životinje, najzastupljenija vrsta je *A. flavus* (73,61%), zatim slede *A. fumigatus* (31,94%), *A. ochraceus* (23,16%) i *A. niger* (4,17%) (tabela 4). Navedene vrste se smatraju potencijalno toksigenim jer biosintetišu aflatoksine, ohratoksine i druge mikotoksisne (*Scudamore*, 1994; *Merouck i Concibido*, 1996; *Resanović*, 2000).

Na ispitivanim uzorcima hrane za životinje od gljiva iz roda *Fusarium* najzastupljenija vrsta je *F. verticillioides* (36,11%), zatim slede *F. proliferatum* (15,28%) i *F. subglutinans* (2,78%) (tabela 4). Sve izolovane *Fusarium* vrste smatraju se potencijalno toksigenim jer biosintetišu brojne mikotoksine od kojih su najznačajniji zearalenoni, trihoteceni i fumonizini (*Burgess i sar.*, 1994; *Merouck i Concibido*, 1996).

Na osnovu dobijenih rezultata samo određivanje ukupnog broja gljiva je nedovoljno da bi se ocenio kvalitet hrane za životinje. Identifikacija rodova i vrsta gljiva ukazuje na potencijalno prisustvo mikotoksina, pa je za kompletnu analizu hrane za životinje potrebno odrediti i sadržaj mikotoksina. O različitim vrstama gljiva iz roda *Fusarium* i mikotoksina koje ih proizvode u različitim uzorcima hrane za životinje *Krnjaja i sar.* (2004) su objavili poseban rad.

Tabela 4. Procentualna zastupljenost *Aspergillus* spp. i *Fusarium* spp. u ispitivanim uzorcima hrane za životinje

Table 4. Percentile frequency of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. in investigation samples of animal feed

Vrsta gljive - Fungal species	Zastupljenost (%) - Frequency (%)
<i>Aspergillus flavus</i>	73,61
<i>Aspergillus fumigatus</i>	31,94
<i>Aspergillus ohraceus</i>	23,61
<i>Aspergillus niger</i>	4,17
<i>Fusarium verticillioides</i>	36,11
<i>Fusarium proliferatum</i>	15,28
<i>Fusarium subglutinans</i>	2,78

Zaključak

Na osnovu urađenih ispitivanja može se zaključiti sledeće:

Primenom standardnih mikrobioloških metoda u analizi 72 uzoraka različitih vrsta hrane za životinje poreklom sa teritorije Republike Srbije ustanovljeno je da 6,94% uzoraka hrane za mlade kategorije životinja i 15,28% uzoraka hrane za starije kategorije životinja ne odgovara, dok 77,78% uzoraka hrane za obe kategorije životinja odgovara propisanim uslovima za ispravnost hrane za životinje.

U ispitivanim uzorcima hrane za životinje izolovano i identifikovano je pet rodova gljiva, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* i *Rhizopus*, od kojih je rod *Aspergillus* imao najveću zastupljenost (79,17%) a rod *Mucor* najmanju (30,56%).

Izolacijom vrsta gljiva iz rodova *Aspergillus* i *Fusarium* identifikovane su sledeće potencijalno toksigene vrste: *A. flavus* (73,61%), *A. fumigatus* (31,94%), *A. ohraceus* (23,16%), *A. niger* (4,17%), *F. verticillioides* (36,11%), *F. proliferatum* (15,28%) i *F. subglutinans* (2,78%).

Potrebno je istaći da su vrste gljiva iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* najčešći producenti različitih i veoma opasnih mikotoksina (aflatoksini, ohratoksini, zearalenoni, trihoteceni, fumonizini) u hrani za životinje.

Iako je u navedenim rezultatima ustanovljen mali procenat uzoraka sa nedozvoljenim brojem gljiva, učestalost rodova i vrsta gljiva koji su značajni producenti mikotoksina nije zanemarljiva. Iz ovog razloga redovna

mikrobiološka, ali i mikotoksikološka analiza, bi trebalo da su neophodne metode za utvrđivanje kvalitetne i zdravstveno ispravne hrane za životinje.

THE PRESENCE OF POTENTIAL TOXIGENIC FUNGI IN ANIMAL FEED WITH PARTICULAR REWIEV ON SPECIES OF GENERA *ASPERGILLUS* AND *FUSARIUM*

V. Krnjaja, J. Lević, Z. Tomić, Lj. Stojanović, S. Trenkovski, Z. Nešić, G. Marinkov

Summary

The presence of potential toxigenic fungi genera was investigated in 72 samples of different kinds of animal feed. A total five genera of fungi were isolated and identified with followed degree of frequency: *Aspergillus* (79,17%), *Rhizopus* (70,83%), *Penicillium* (68,06%), *Fusarium* (51,39%) i *Mucor* (30,56%). The most frequent of the species of fungi from genera *Aspergillus* and *Fusarium* were isolated: *A. flavus* (73,61%), *A. fumigatus* (31,94%), *A. ochraceus* (23,16%), *A. niger* (4,17%), *F. verticillioides* (36,11%), *F. proliferatum* (15,28%) i *F. subglutinans* (2,78%).

Key words: animal feed, total number of fungi (moulds), toxigenic species, *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp.

Zahvalnost: Zahvaljujemo Sandri Drakić za tehničku pomoć u mikrobiološkoj analizi.

Literatura

BHAT, R.V., VASANTHI, S. (1999): Mycotoxin contamination of foods and feeds - Overview, occurrence and economic impact on food availability, trade, exposure of farm animals and related economic losses, 1-12. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. Tunis (Tunisia), 3-6 March 1999.

BURGESS, L.W., SUMMERELL, B.A., BULLOCK, S., GOTT, K.P., BACKHOUSE, D. (1994): Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney, pp. 133.

CRNOJEVIĆ, Z., PEŠUT, M., ZLATIC, H., BOSNIĆ, P., DOLENEC, Ž. (1980): Uticaj oštećenog kukuruza u krmnoj smeši na prirast i iskorišćavanje hrane svinja u tovu. Agr. glas. 1 (5), 15.

ĐILAS, S., ŽIVKOV-BALOŠ, M., MIHALJEV, Ž, MRĐEN, M., MAŠIĆ Z. (2001): Chemical, microbiological and mycotoxicological safety of animal diet mixes in the period from January 1999 to January 2000. Vet. glasnik (1-2), 61-67.

HARLEY, R.M. (1997): Mycotoxins in cereals. 1-25. D'Mello J.F.D. (ed.), Mycotoxins and Environmental Health. Handbook for SAC Mycotoxin Workshop. Edinburg (England), September 1997.

JOFFE, A.Z. (1983): *Fusarium* as field, stored and soil fungi under semiarid conditions in Israel. II-3: 95-110. Ueno, Y. (ed.), Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Kodansha LTD., Tokyo and Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York.

KRNJAJA V., LEVIĆ, J., TOMIĆ, Z. (2004): Kontaminacija hrane za životinje toksigenim vrstama roda *Fusarium* i mikotoksinima u Srbiji. Biotehnologija u stočarstvu, 20(5-6), 281-292. XVI Inovacije u stočarstvu. Beograd, 17-18. novembar 2004. godine.

LEVIĆ, J., STOJKOV, S. (2002): Stvaranje fuzariotoksina u uslovima proizvodnje i čuvanja kukuruza. Agroinovacije 3, 153-161.

LONČAREVIĆ, A. PENČIĆ, V., SMILJAKOVIĆ, H., GOTOVČIĆ, S. (1972): Mikotoksikoza svinja prouzrokovana gljivicama roda *Fusarium*. Dokumentacija za tehnologiju i tehniku u poljoprivredi (9-10), 1-7.

MARKOVIĆ, R., JOVANOVIĆ, N., ŠEFER, D., SINOVEC, Z. (2005): Kontaminacija smeša za ishranu svinja i živine plesnima i mikotoksinima. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke/Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad, 109, 89-95.

MAŠIĆ, Z., JAKIĆ-DIMIĆ, D., STANAČEV, V., SINOVEC, Z. (2002): Survey of quality of swine feed mixes. Vet. glasnik 56, 41-52.

MERONUCK, R., CONCIBIDO, V. (1996): Mycotoxins in feed. Feedstuffs 68 (30), 139-145.

MIHAJLOVIĆ, B. (1983): Priručnik za identifikaciju bakterija, kvasaca i plesni. Savez veterinarara i veterinarskih tehničara Jugoslavije - Odbor za izdavačku delatnost, Beograd. pp. 344.

MRĐEN, M., MAŠIĆ, Z., MILORADOVIĆ, S., ROGOŽARSKI, D. (1990): Najčešći mikrobiološki kontaminanti stočne hrane. Vet. glasnik 44, 1095-1100.

NELSON, P.R., DESJARDINS, A.E, PLATTNER, R.D. (1993): Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. Ann. Rev. Phytopathol. 31, 233-252.

NELSON, P. E., TOUSSOUN, T.A., MARASAS, W.F.O. (1983): *Fusarium* Species, an Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, pp. 133.

RESANOVIĆ, R. (2000): Značaj aflatoksina u veterinarskoj medicini. Clinica veterinaria, Budva, 12.-16. juna 2000. godine, 178-182.

SL. LIST SRJ (1990): Pravilnik o maksimalnim količinama štetnih materija i sastojaka u stočnoj hrani. No. 2.

SCUDAMORE, K.A. (1993): Mycotoxins in stored products: Myth or menace. International Biodeterioration & Biodegradation 32, 191-203.

SWEENEY, M.J., DOBSON, A.D.W. (1998): Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. Intern. J. Food Microbiol. 43: 141-158.

ŠEFER, D., JOVANOVIĆ, N., MARKOVIĆ, R., KRNJAJIĆ, D., NEDELJKOVIĆ-TRAILOVIĆ, J., SINOVEC, Z. (1998): Pregled kvaliteta krmnih smeša za ishranu živine. Vet. glasnik, 52 (7-8), 425-435.

ŠKRINJAR, M., RISTIĆ, M., GRBIĆ, Z. (1995): Contamination of broiler chicken's mash and litter with moulds, aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone. Acta Veterinaria Hungarica 43, 117-124.

UENO, Y. (1983): Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Kodansha LTD., Tokyo and Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, 316.