

Fungal contaminants in Sicilian livestock feeds and first studies on the enzymatic activity of *Aspergillus* isolates

Contaminantes fúngicos en piensos para ganado siciliano y primeros estudios sobre la actividad enzimática de aislados de *Aspergillus*.

Mirabile, G.¹, Bella, P.¹, Conigliaro, G.¹, Giambra, S.¹, Alberto Vazquez, M.², Davino, S.¹ and Torta, L.^{1*}

¹Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (SAAF)

Università degli Studi di Palermo

Viale Delle Scienze, Ed. 5, 90128 Palermo, Italy

²Instituto de Ciencia Animal (ICA), San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba

*Email: livio.torta@unipa.it

The purposes of this study were 1) to determine the total fungal contamination in Sicilian raw materials and livestock, 2) to evaluate the occurrence of *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* and *Fusarium spp.*, 3) to identify fungi belonging to the genus *Aspergillus* and 4) to determine their ability to produce cellulolytic enzymes. Fourteen feed samples were collected in a feed mill near to Palermo (Sicily, Italy). Analysis of the total mycobiota was performed on Sabourad Dextros Agar (SAB) and Potato Dextrose Agar (PDA) and total fungal counts were expressed as CFU/g. *Aspergillus spp.* isolates were selected on the basis of the frequency of isolation and identified using micro and macro-morphological characteristics and ITS sequence analysis. The ability of the *Aspergillus* isolates to produce cellulolytic enzymes was tested qualitatively by *in vitro* assay at two temperature, 25 and 30 °C, and in static and shaking condition. Total fungal population ranged from 1.11x10⁶ to 1.31x10⁸ and from 1.11x10³ to 1.58x10⁶ CFU/g on PDA and SAB, respectively. All feed samples showed the recurrent presence of colonies belonging mostly to the ubiquitous genera *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. Eight isolates of *Aspergillus spp.* were obtained and identified as *A. amstelodami*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* and *A. tubingensis*. Between them, *A. awamori*, *A. niger* and *A. tubingensis* showed the highest enzymatic activity. The presence of potential mycotoxigenic isolates of *Aspergillus spp.* in the analysed feeds represents a risk for animal health; moreover their ability to produce cellulolytic enzymes can seriously affect feed quality.

Key words: *toxygenic moulds*, *raw materials*, *animal foods*, *cellulolytic activity*.

Fungal contamination in food and feed cause significant economic losses in primary agricultural yields, in the transforming industries and in livestock farms (Godfray *et al.* 2016). The main contaminant fungi (molds), belonging to several ubiquitous genera, are characterized by the production of large masses of conidia easily spread by air to the soil, water, plants and animals (Adhikari *et al.* 2004). Fungal contamination of the raw materials also occurs during pre-harvest (field-produced fungi) and post-harvest periods, such as storage and transformation processes (storage-produced fungi) (Krnjaja *et al.* 2008 and Whitlow *et al.* 2010). Contaminating fungi prejudice the preservability and the nutritional value of food and feed by the production of lithic enzymes and pose a

Los objetivos de este estudio fueron: 1) determinar la contaminación fúngica total en materias primas y ganado sicilianos, 2) evaluar la aparición de *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Fusarium spp.*, 3) identificar hongos pertenecientes al género *Aspergillus* y 4) determinar su capacidad de producir enzimas celulolíticas. Se recolectaron catorce muestras de alimento en una fábrica de piensos cerca de Palermo (Sicilia, Italia). El análisis de la micobiota total se realizó en Sabourad Dextrose Agar (SAB) y Potato Dextrose Agar (PDA) y los recuentos totales de hongos se expresaron como UFC/g. Los aislados de *Aspergillus spp.* se seleccionaron en función de la frecuencia de aislamiento y se identificaron utilizando características micro y macro morfológicas y análisis de secuencia ITS. La capacidad de los aislados de *Aspergillus* para producir enzimas celulolíticas se probó cualitativamente mediante un ensayo *in vitro* a dos temperaturas, 25 y 30 °C, y en condiciones estáticas y de agitación. La población total de hongos varió de 1.11x10⁶ a 1.31x10⁸ y de 1.11x10³ a 1.58x10⁶ UFC/g en PDA y SAB, respectivamente. Todas las muestras de pienso mostraron la presencia recurrente de colonias pertenecientes, principalmente, a los géneros ubicuos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Ocho aislados de *Aspergillus spp.* se obtuvieron e identificaron como *A. amstelodami*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* y *A. tubingensis*. Entre ellos, *A. awamori*, *A. niger* y *A. tubingensis* mostraron la mayor actividad enzimática. La presencia de potenciales aislados micotoxigénicos de *Aspergillus spp.* en los piensos analizados representan un riesgo para la salud animal; además, su capacidad para producir enzimas celulolíticas puede afectar seriamente la calidad del pienso.

Palabras claves: *mohos toxigénicos*, *materias primas*, *alimentos de origen animal*, *actividad celulolítica*.

La contaminación fúngica en alimentos y piensos causa importantes pérdidas económicas en los rendimientos agrícolas primarios, en las industrias transformadoras y en las explotaciones ganaderas (Godfray *et al.* 2016). Los principales hongos contaminantes (mohos), que pertenecen a varios géneros ubicuos, se caracterizan por la producción de grandes masas de conidias que se propagan fácilmente por aire al suelo, al agua, a las plantas y a los animales (Adhikari *et al.* 2004). La contaminación fúngica de las materias primas también se produce durante la precosecha (hongos producidos en el campo) y los períodos poscosecha, como los procesos de almacenamiento y transformación (hongos producidos por el almacenamiento) (Krnjaja *et al.* 2008 y Whitlow *et al.* 2010). Los hongos contaminantes perjudican la preservabilidad y el valor nutricional de los

potential risk for consumer health by mycotoxigenic activity (McNeil *et al.* 1984).

The cellulolytic activity is widely distributed in the contaminating fungi belonging to Phylum Ascomycota as in the genera *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* and *Trichoderma* (Lynd *et al.* 2002 and Tian *et al.* 2009). They dominate, both in abundance and in activity, the microbial community responsible for the decomposition of cellulose residues (Wilson, 2011).

Among these, species belonging to the genus *Aspergillus* are able to produce a large variety of glucanases that allow the complete degradation of cellulose.

Moreover, species belonging to genera *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, able to produce dangerous mycotoxins, can cause metabolic disorders resulting in biological effects on animals as liver and kidney toxicity, central nervous system effects and estrogenic effects (Greco *et al.* 2014). Some contaminating mycotoxin due secondary contamination in humans via eggs, meat or milk (carry-over effect), with acute and chronic toxic effects (Volkel *et al.* 2011).

In particular, the contamination of feeds with fungi and their spores is worldwide described. In tropical regions *Aspergillus spp.* predominate in several feeds and *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria* species are recurrent contaminants of kernels and other grains (Prasad *et al.* 2016). In Sicily, recent studies on local row materials and feeds shown low mycotoxins contamination levels, if compared to imported products, while very few are the data on the level of fungal colonization (Finoli and Vecchio, 2003, Gallo *et al.* 2008 and Russo, 2015).

The aim of this study was to evaluate, in Sicilian raw materials and livestock feeds, the total fungal contamination and to detect the percentage of the three potential mycotoxigenic genera (*Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*). Moreover, the most recurrent *Aspergillus* isolates, identified at level of specie by morphological and molecular methodologies, was tested to evaluate their cellulolytic activity.

Materials and Methods

Sampling. A total of fourteen feed samples (table 1) were collected in a feed mill located in the province of Palermo (Sicily, Italy) following the standard methodologies (Reg. CE 1441/2007; Reg. CE 401/2006; DM 20/04/1978). Aliquots of 600 g were randomly taken from different parts of the bag or container of each feed both from packaging and storage areas. The samples were placed in sterile plastic bags, transported to the laboratory and stored at 4 °C until further analysis.

Fungal contamination. Isolation and enumeration

alimentos y piensos mediante la producción de enzimas líticas y representan un riesgo potencial para la salud del consumidor por la actividad micotoxigénica (McNeil *et al.* 1984).

La actividad celulolítica está ampliamente distribuida en los hongos contaminantes pertenecientes al Tipo Ascomycota, como en los géneros *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Lynd *et al.* 2002 y Tian *et al.* 2009). Dominan, tanto en abundancia como en actividad, la comunidad microbiana responsable de la descomposición de los residuos de celulosa (Wilson 2011).

Entre estas, las especies que pertenecen al género *Aspergillus* son capaces de producir una gran variedad de glucanases que permiten la degradación completa de la celulosa.

Además, las especies que pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, capaces de producir micotoxinas peligrosas, pueden causar trastornos metabólicos que producen efectos biológicos en animales como toxicidad hepática y renal, efectos en el sistema nervioso central y efectos estrogénicos (Greco *et al.* 2014). Algunas micotoxinas contaminantes se deben a la contaminación secundaria en humanos a través de huevos, carne o leche (efecto de arrastre), con efectos tóxicos agudos y crónicos (Volkel *et al.* 2011).

En particular, la contaminación de los piensos con hongos y sus esporas se describe en todo el mundo. En las regiones tropicales, *Aspergillus spp.* predominan en varios piensos y las especies de *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* son contaminantes recurrentes de los granos (Prasad *et al.* 2016). En Sicilia, estudios recientes sobre materias primas y piensos locales mostraron niveles bajos de contaminación por micotoxinas, en comparación con productos importados, mientras que muy pocos son los datos sobre el nivel de colonización de hongos (Finoli y Vecchio 2003, Gallo *et al.* 2008 y Russo 2015).

El objetivo de este estudio fue evaluar, en las materias primas sicilianas y los piensos para ganado, la contaminación fúngica total y detectar el porcentaje de los tres géneros micotoxigénicos potenciales (*Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*). Además, los aislados de *Aspergillus* más recurrentes, identificados a nivel de especie mediante metodologías morfológicas y moleculares, se analizaron para evaluar su actividad celulolítica.

Materiales y Métodos

Muestreo. Un total de catorce muestras de piensos (tabla 1) se recogieron en una fábrica de piensos ubicada en la provincia de Palermo (Sicilia, Italia) siguiendo las normas metodológicas (Reg. CE 1441/2007; Reg. CE 401/2006; DM 20/04 / 1978). Se tomaron aleatoriamente partes alícuotas de 600 g de diferentes partes de la bolsa o contenedor de cada pienso, tanto de las áreas de empaque como de almacenamiento. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas estériles, se transportaron al laboratorio

Table 1. Feed samples collected in a feed mill in the province of Palermo

Code	Sample	Composition	Sampling area
1	Flaked broad bean	Raw material	Packaging area
2	Oat	Raw material	
3	Poultry feed	Soy flour, cornmeal, maize, wheat bran	
4	Flaked maize	Raw material	
5	Swine feed	Maize, wheat bran, barley, sunflower flour, carob, citrus peel	
6	Horses feed (West Performance)	Wheat bran, broad bean, flaked barley, carobs, maize, oat flour, molasses	
7	Cattle feed	Maize, barley, carobs, broad bean	
8	Poultry feed	Soy, corn, wheat bran, maize	Finished product storage area
9	Horses feed (West Performance)	Wheat bran, broad bean, flaked barley, carobs, maize, oat flour, molasses	
10	Flaked broad bean	Raw material	
11	Cattle feed	Maize, barley, carobs, broad bean	
12	Flaked maize	Raw material	
13	Horses feed (Superior House)	Flaked broad bean, flaked maize, flaked barley, flaked oat, flaked corn, sunflower flour	
14	Ruminants feed	Broad bean, barley flour, maize, wheat bran	

of fungal colonies were carried out using serial dilution and spread plate technique (Maina *et al.* 2016). All samples were ground with a mill up to 0.25 mm and 1 g of each sample was homogenized in 10 mL of distilled sterilized water. Samples were analyzed in triplicate. Aliquots (0.1 mL) of ten-fold serial dilutions were inoculated in Sabouraud Dextrose Agar (SAB) and Potato Dextrose Agar (PDA) in order to evaluate the medium efficiency (the highest number of colonies). All plates were incubated at 22 °C for 9 days and the total fungal count (CFU/g) and relative percentage of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* colonies were evaluated under stereomicroscope every 3 days. Single colonies of *Aspergillus spp.* were sub-cultured into PDA and monoconidial pure cultures of each strain were obtained and used for further characterization. All the isolates were maintained into PDA agar slants and cryopreserved in 15 % glycerol at -80 °C.

Morphological identification of Aspergillus species. Macro-morphological features of the *Aspergillus* isolates were determined in PDA, SAB and Czapek dox Agar (CZ) according to Lin and Dianese (1976) and Thathana *et al.* (2017). For each *Aspergillus* isolate, plugs from the edge of 7-day-old pure colonies were taken by a sterile 3 mm cork borer and placed singly at the center of 10 cm diameter plates with the three different media, in three replicates. The plates were incubated at 25°C for 9 days and diameter, growth rate, color (conidia and reverse), shape and texture of each colony were recorded every 3 days. Microscopic observations were performed at the microscope Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to an AxioCam MRc5 (Zeiss, Oberkochen, Germany) digital

and se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

Contaminación fúngica. El aislamiento y la enumeración de colonias fúngicas realizaron utilizando una técnica de dilución en serie y placa de extensión (Maina *et al.* 2016). Todas las muestras se molieron en un molino hasta 0.25 mm y 1 g de cada muestra se homogeneizó en 10 mL de agua destilada esterilizada. Las muestras se analizaron por triplicado. Se inocularon partes alícuotas (0.1 mL) de diluciones en serie de diez veces en Sabouraud Dextrose Agar (SAB) y Potato Dextrose Agar (PDA) para evaluar la eficacia del medio (el mayor número de colonias). Todas las placas se incubaron a 22 °C durante 9 días y el recuento total de hongos (UFC/g) y el porcentaje relativo de colonias de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* se evaluaron con estereomicroscopio cada 3 días. Colonias individuales de *Aspergillus spp.* se subcultivaron en PDA y se obtuvieron cultivos puros monoconidiales de cada cepa y se utilizaron para una caracterización adicional. Todos los aislados se mantuvieron en agar PDA en plano inclinado y se crioconservaron en glicerol al 15 % a -80 °C.

Identificación morfológica de especies de Aspergillus. Las características macro-morfológicas de los aislados de *Aspergillus* se determinaron en PDA, SAB y Agar Czapek dox (CZ) de acuerdo con Lin y Dianese (1976) y Thathana *et al.* (2017). Para cada aislado de *Aspergillus*, los tapones del borde de las colonias puras de 7 días se tomaron con un perforador de corcho estéril de 3 mm y se colocaron individualmente en el centro de placas de 10 cm de diámetro con los tres medios diferentes, en tres repeticiones. Las placas se incubaron a 25 °C durante 9 días y el diámetro, la tasa de crecimiento, el color (conidios y reverso), la forma y la textura de cada colonia se registraron cada 3 días. Se realizaron observaciones microscópicas en el microscopio Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Alemania) acoplado a

camera. Images were captured using the software AxioVision 4.6 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The microscopic features were conidial heads, vesicle shape and diameter, presence of metulae and size and shape of phialides and conidia (30-50 measurements) (table 3). The identification was carried out using taxonomic keys (Barnett and Hunter 1972, von Arx 1981, Cole and Kendrick 1989, Pitt and Hocking 1999 and Klich, 2002).

DNA extraction, PCR and sequencing. Genomic DNA was extracted from pure colonies of the most recurrent *Aspergillus* isolates following the CTAB-based method (Torta *et al.*, 2015). The DNA was suspended in 100 μ L of TE 1x (0.121g of Tris 10 mM and 0.037g of EDTA 1mM in 100 mL of distilled water) quantified by using NanoDrop ND-1000 and stored at -20 °C. The primers ITS1F (Gardes and Bruns 1993) and ITS4 (White *et al.* 1990) were used for the amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 region. The PCR assay was performed in a total reaction volume of 25 μ L consisting of PCR buffer 10X (Thermo Scientific), 0.2 mM of each dNTPs, 0.3 μ M of each primer, 0.5 U of Taq DNA polymerase (Dream Taq, Thermo Scientific) and 1 μ L of target DNA. The amplification was carried out in a MultiGene OptiMax thermocycler (Labnet International Inc.) with an initial denaturation cycle at 94 °C for 3 min followed by 35 cycles at 94 °C for 30s, annealing at 55 °C for 30s, elongation at 72 °C for 45 s, with a final extension at 72 °C for 10 min.

PCR products were separated by electrophoresis in 1% agarose gel and amplicons were detected under UV transilluminator (330 nm).

PCR products were purified using Exo I-SAP protocol according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primer ITS1F was used in the sequencing reaction. Sequencing reactions were performed with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) followed by Ethanol/EDTA/Sodium Acetate precipitation (according to manufacturer's instruction). Finally, capillary electrophoresis was performed in the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequences were aligned against those already deposited in the GenBank databases using BLASTn tool (Altschul *et al.* 1990). New sequences were deposited in GenBank.

Qualitative determination of the cellulolytic activity. The cellulolytic activity of the *Aspergillus* isolates was performed according to Mandels *et al.* (1976) and Ghorbani *et al.* (2015). The strains were grown in 10 mL of Mandels liquid medium (Mandels *et al.* 1976) in tubes containing a 1x6 cm Whatman No 1 paper strips and incubated at temperatures of 25 and 30 °C under static condition, in order to evaluate the effect of temperature on the cellulolytic activity. The control was tubes not inoculated. Cellulolytic activity was also evaluated in shaking condition

una cámara digital AxioCam MRc5 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las imágenes se capturaron utilizando el software AxioVision 4.6 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las características microscópicas fueron las cabezas conidiales, la forma y el diámetro de las vesículas, la presencia de metulas y el tamaño y la forma de los fialidos y las conidias (30-50 mediciones) (tabla 3). La identificación se realizó mediante claves taxonómicas (Barnett y Hunter 1972, von Arx 1981, Cole y Kendrick 1989, Pitt y Hocking 1999 y Klich, 2002).

Extracción de ADN, PCR y secuenciación. El ADN genómico se extrajo de colonias puras de los aislados de *Aspergillus* más recurrentes siguiendo el método basado en CTAB (Torta *et al.* 2015). El ADN se suspendió en 100 μ L de TE 1x (0.121 g de Tris 10 mM y 0.037 g de EDTA 1 mM en 100 mL de agua destilada) cuantificado usando NanoDrop ND-1000 y almacenado a -20 °C. Los cebadores ITS1F (Gardes y Bruns 1993) e ITS4 (White *et al.* 1990) se usaron para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2. El ensayo de PCR se realizó en un volumen de reacción total de 25 μ L que consta de tampón de PCR 10X (Thermo Scientific), 0.2 mM de cada dNTPs, 0.3 μ M de cada cebador, 0.5 U de ADN polimerasa Taq (Dream Taq, Thermo Scientific) y 1 μ L de ADN objetivo. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MultiGene OptiMax (Labnet International Inc.) con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 45 s, con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se detectaron amplicones bajo transiluminador UV (330 nm).

Los productos de PCR se purificaron utilizando el protocolo Exo I-SAP de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). El cebador ITS1F se usó en la reacción de secuenciación. Las reacciones de secuenciación se realizaron con BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguido de precipitación con etanol/EDTA/acetato de sodio (según las instrucciones del fabricante). Finalmente, la electroforesis capilar se realizó en el analizador genético 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias se alinearon contra las ya depositadas en las bases de datos GenBank utilizando la herramienta BLASTn (Altschul *et al.* 1990). Se depositaron nuevas secuencias en GenBank (tabla 3).

Determinación cualitativa de la actividad celulolítica. La actividad celulolítica de los aislados de *Aspergillus* se realizó de acuerdo con Mandels *et al.* (1976) y Ghorbani *et al.* (2015). Las cepas se cultivaron en 10 mL de medio líquido Mandels (Mandels *et al.* 1976) en tubos que contenían tiras de papel Whatman No 1 de 1x6 cm y se incubaron a temperaturas de 25 y 30 °C en condiciones estáticas, para evaluar el efecto de temperatura en la actividad celulolítica. El control fueron tubos no

(90 rpm) at 30 °C. After 5, 10, 15 and 21 days, fungal growth and paper maceration were evaluated by using a rating scale from 0 to 5 (0 = no fungal growth and no maceration; 5 = complete paper colonization and maceration).

Statistical analysis. Data on total fungal contamination were subjected to analysis of variance (ANOVA) through the Statgraphics Plus 5.1 program. The averages were compared by the Fisher LSD multiple comparison test ($P \leq 0.05$).

Results

Fungal contamination of feed samples. All feed samples showed fungal contamination, and total fungal count varied within the samples and also in relation to culture medium (figure 1). At the third day of incubation, on PDA, fungal colonies were observed only on sample 1 (flaked broad bean), while on SAB they were present in 12 out of 14 feed samples. At 6 days number of fungal colonies increased in all the samples both on SAB and PDA. These values remained fairly constant until the ninth day but in PDA total fungal population was higher than in SAB. Total population ranged from 1.11×10^6 to 1.31×10^8 and from 1.11×10^3 to 1.58×10^6 CFU/g on PDA and SAB respectively. Statistically significant differences were observed at nine days of incubation within the feed samples on both media, although total fungal contamination was similar in the two sampling areas (table 2). Oat (sample 2) and poultry feed (sample 8) showed the highest level of total fungal contamination on PDA and on SAB respectively (table 2). Regarding the potential mycotoxigenic fungal genera, colonies belonging to *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* were obtained on 3 (samples 1, 3, 12, on PDA) and on 4 (1, 3, 11, 12 on SAB) out of 14 samples. The frequency of the three isolated genera is shown in figure 2. In general, *Fusarium* sp. was the prevalent species isolated (from 10 and 7 samples, respectively on PDA and SAB). *Penicillia*, isolated from 5 and 4 samples on PDA and SAB respectively shown the lower frequency. Nevertheless, the percentage of the three genera varied depending on the culture medium. *Aspergillus* spp. colonies were more frequently isolated on SAB, while *Fusarium* spp. and *Penicillium* on PDA. With regard to total fungal population, the frequency of isolation of *Aspergillus* colonies was about 10% on both media (data not shown), whereas in each sample the percentage ranged from 14 to 36% and from 1.33 to 70% on PDA and SAB respectively.

Identification of Aspergillus spp. *Aspergillus* spp. were isolated from 8 out of 14 feed samples and eight isolates belonging to Section Nigri, Section Flavi and Section Nidulantes, were selected on the basis of the frequency of isolation and of the macro-morphological features. The strains belonging to the Section Nigri

inoculados. La actividad celulolítica también se evaluó en condiciones de agitación (90 rpm) a 30 °C. Después de 5, 10, 15 y 21 días, se evaluó el crecimiento de hongos y la maceración de papel utilizando una escala de calificación de 0 a 5 (0 = sin crecimiento de hongos y sin maceración; 5 = colonización completa del papel y maceración).

Análisis estadístico. Los datos sobre contaminación fúngica total se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) a través del programa Statgraphics Plus 5.1. Los promedios se compararon mediante la prueba de comparación múltiple Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

Resultados

Contaminación fúngica de muestras de pienso. Todas las muestras de pienso mostraron contaminación fúngica, y el recuento total de hongos varió dentro de las muestras y también en relación con el medio de cultivo (figura 1). Al tercer día de incubación, en PDA, se observaron colonias de hongos solo en la muestra 1 (habas en hojuelas), mientras que en SAB estuvieron presentes en 12 de las 14 muestras de pienso. A los 6 días, el número de colonias de hongos aumentó en todas las muestras tanto en SAB como en PDA. Estos valores permanecieron bastante constantes hasta el noveno día, pero en PDA la población total de hongos fue mayor que en SAB. La población total varió de 1.11×10^6 a 1.31×10^8 y de 1.11×10^3 a 1.58×10^6 UFC/g en PDA y SAB respectivamente. Se observaron diferencias estadísticamente significativas a los nueve días de incubación dentro de las muestras de pienso en ambos medios, aunque la contaminación fúngica total fue similar en las dos áreas de muestreo (tabla 2). La avena (muestra 2) y el pienso para aves (muestra 8) mostraron el nivel más alto de contaminación fúngica total en PDA y en SAB respectivamente (tabla 2). Con respecto a los posibles géneros micotoxigénicos de hongos, se obtuvieron colonias pertenecientes a *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* en 3 (muestras 1, 3, 12, en PDA) y en 4 (1, 3, 11, 12 en SAB) de 14 muestras. La frecuencia de los tres géneros aislados se muestra en la figura 2. En general, *Fusarium* sp. fue la especie aislada prevalente (de 10 y 7 muestras, respectivamente en PDA y SAB). La *Penicillia*, aislada de 5 y 4 muestras en PDA y SAB respectivamente, mostró la frecuencia más baja. Sin embargo, el porcentaje de los tres géneros varió según el medio de cultivo. Las colonias de *Aspergillus* spp. se aislaron con mayor frecuencia en SAB, mientras que *Fusarium* spp. y *Penicillium* en PDA. Con respecto a la población total de hongos, la frecuencia de aislamiento de las colonias de *Aspergillus* fue de aproximadamente 10% en ambos medios (datos no mostrados), mientras que en cada muestra el porcentaje varió de 14 a 36% y de 1.33 a 70% en PDA y SAB respectivamente.

Identificación de Aspergillus spp. *Aspergillus* spp. se aislaron 8 de las 14 muestras de pienso y se seleccionaron ocho aislamientos pertenecientes a la Sección Nigri, Sección Flavi y Sección Nidulantes, en función de la frecuencia de aislamiento y de las características macro-

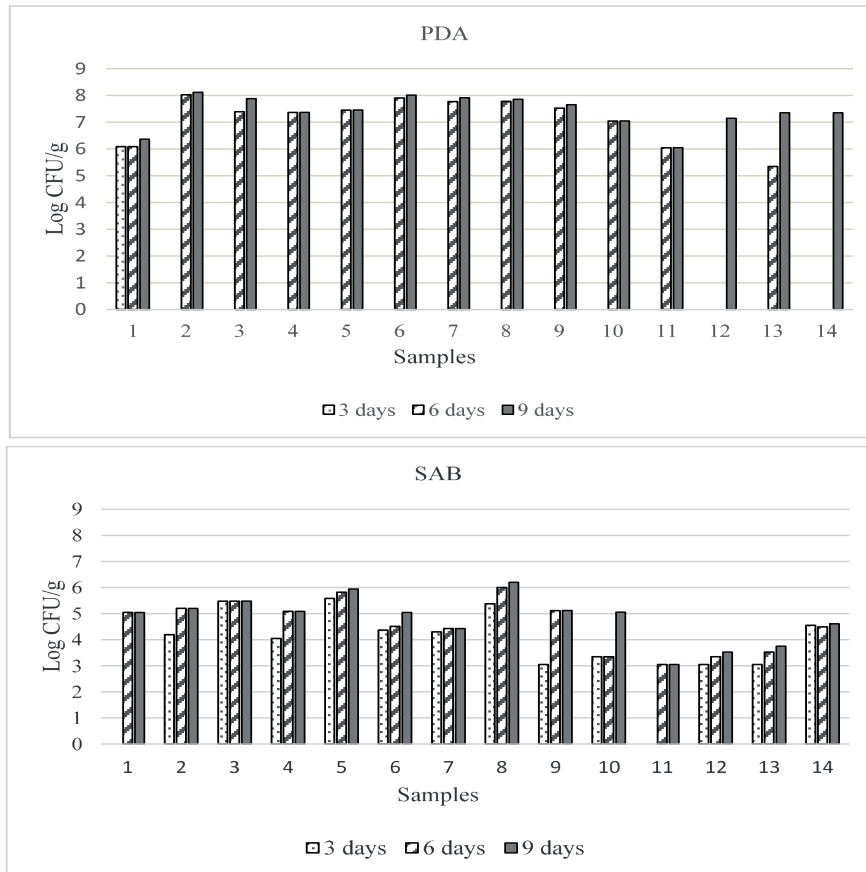


Figure 1. Total fungal contamination detected in the 14 feed samples at 3, 6 and 9 days of incubation, on PDA (above) and SAB (below)

Table 2 - Total fungal contamination in the analyzed feed samples at 9 days of incubation on PDA and SAB, expressed in Log of UFC/g and relative percentage of Aspergillus colonies.

Sample	PDA	%Aspergillus	SAB	%Aspergillus
1= Flaked broad bean	6.37 + 2.28 ^a	0.00	5.05 + 1.84 ^{ab}	0.00
2= Oat	8.12 + 0.39 ^c	25.00	5.20 + 0.30 ^{ab}	59.00
3= Poultry feed	7.88 + 0.40 ^{abc}	0.00	5.48 + 0.22 ^{ab}	0.00
4= Flaked maize	7.37 + 0.46 ^{ab}	36.00	5.09 + 1.85 ^{ab}	0.00
5= Swine feed	7.46 + 0.41 ^{ab}	31.00	5.94 + 0.08 ^{bc}	3.00
6= Horses feed	8.01 + 0.88 ^{bc}	0.00	5.05 + 1.74 ^{ab}	0.00
(West Performance)				
7= Cattle feed	7.91 + 0.17 ^{bc}	18.00	4.43 + 0.09 ^a	8.00
8= Poultry feed	7.85 + 0.14 ^{abc}	14.00	6.20 + 0.26 ^c	1.33
9= Horses feed	7.65 + 0.09 ^{ab}	20.00	5.12 + 0.52 ^{ab}	70.00
(West Performance)				
10= Flaked broad bean	7.05 + 2.50 ^a	0.00	5.05 + 1.63 ^{ab}	66.00
11= Cattle feed	6.05 + 2.17 ^a	0.00	3.05 + 1.17 ^a	0.00
12= Flaked maize	7.15 + 0.59 ^a	0.00	3.52 + 1.22 ^a	0.00
13= Horses feed	7.35 + 0.66 ^{ab}	0.00	3.74 + 1.30 ^a	60.00
(Superior House)				
14= Ruminants feed	7.35 + 2.50 ^{ab}	0.00	4.60 + 1.54 ^a	0.00

^{abcd}In Each column, values followed by same letters are not statistically different according to Fisher LSD Test (P≤0.05).

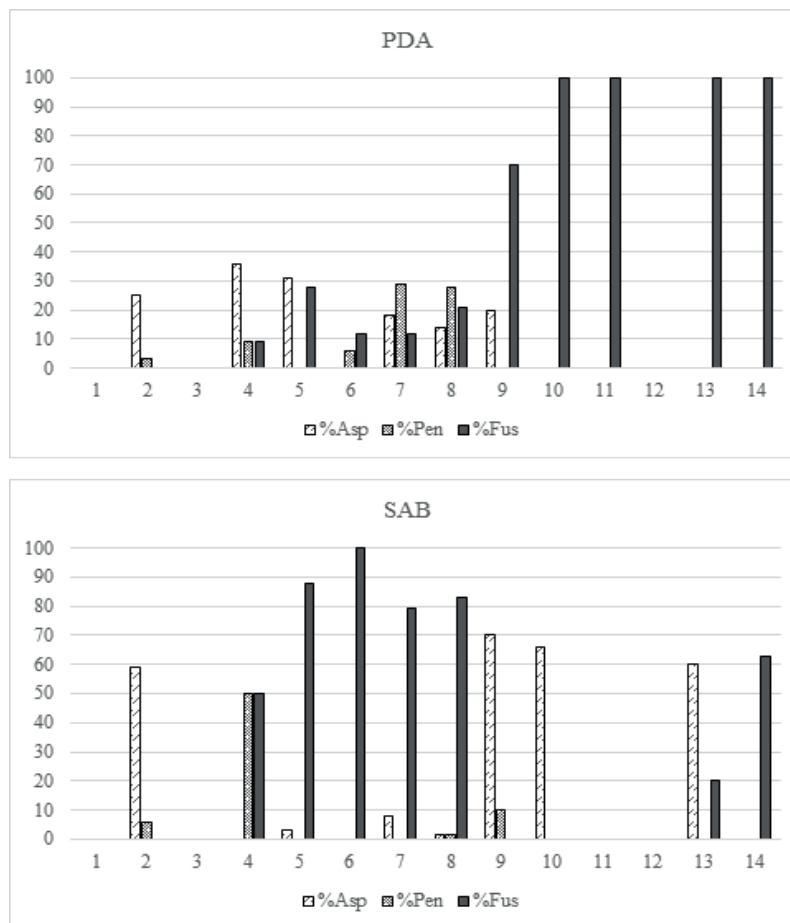


Figure 2 Frequency of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* isolated at 9 days of incubation on PDA (above) and SAB (below) from 14 feed samples

presented colonies with dark-brown to black colour and reverse pale or light yellow color; the conidiophores bearing spherical vesicles were uniseriate or biseriata producing globular or subglobular conidia (smooth, finely rough or rough). Isolates belonging to the Section Flavi were characterized by typical yellow-green mature conidia, reverse light yellow to yellow colour; mainly uniseriate conidiophores with globular vesicle producing globular conidia (smooth or finely rough). Isolates of Section Nidulantes presented colonies with pale yellow or yellow colour and reverse yellow or pale orange color; microscopically they presented uniseriate conidiophores, subglobular vesicles, subglobular rough spores and characteristic Hulle's cells. Based on morphological characteristics, the isolates were identified as *Aspergillus amstelodami* (L. Mangin) Thom & Church (figure 3), *Aspergillus awamori* Nakaz., *Aspergillus flavus* Link., *Aspergillus niger* Tiegh., *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn. and *Aspergillus tubingensis* Mosseray (table 3).

An amplicon from about 500 to 600 bp of the ribosomal region including the two non-coding ITS1 and ITS2, and the 5.8S rDNA gene was amplified from 8 *Aspergillus spp.* isolates. *Aspergillus spp.* isolates had high match with published sequences in GenBank showing maximum identities of 99–100 % with

morfológicas. Las cepas pertenecientes a la Sección Nigri presentaron colonias de color marrón oscuro a negro e inversa de color amarillo pálido o amarillo claro; los conidióforos que portaban vesículas esféricas fueron uniseriados o biseriados produciendo conidios globulares o subglobulares (lisos, finamente rugosos o rugosos). Los aislados pertenecientes a la Sección Flavi se caracterizaron por conidios maduros amarillo verdosos típicos, inverso de color amarillo claro a amarillo; principalmente conidióforos uniseriados con vesículas globulares que producen conidios globulares (lisos o finamente rugosos). Los aislados de la sección Nidulantes presentaron colonias de color amarillo pálido o amarillo e inverso, color amarillo o naranja pálido; microscópicamente presentaron conidióforos uniseriados, vesículas subglobulares, esporas rugosas subglobulares y células características de Hulle. Basado en las características morfológicas, los aislados se identificaron como *Aspergillus amstelodami* (L. Mangin) Thom & Church (figura 3), *Aspergillus awamori* Nakaz., *Aspergillus flavus* Link., *Aspergillus niger* Tiegh., *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn. y *Aspergillus tubingensis* Mosseray (tabla 3).

Un amplicón de aproximadamente 500 a 600 pb de la región ribosómica, que incluye los dos ITS1 e ITS2 no codificantes, y el gen de ADNr 5.8S se amplificó a partir de 8 aislados de *Aspergillus spp.* Los aislados *Aspergillus spp.* tuvieron una alta coincidencia con las secuencias

Apergillus sections Nigri (*A. awamori*, *A. niger*, *A. tubingensis*), Flavi (*A. flavus*, *A. oryzae*) and Nidulantes (*A. amstelodami*) (table 3).

publicadas en el GenBank mostrando identidades máximas de 99 a 100 % con secciones Nigri de Apergillus (*A. awamori*, *A. niger*, *A. tubingensis*), Flavi (*A. flavus*, *A. oryzae*) y Nidulantes (*A. amstelodami*) (tabla 3).

Table 3. Morphological features of the 8 *Aspergillus* spp. isolated from feed samples. T= teleomorph (sexual reproductive stage); A= anamorph (asexual reproductive stage)

Isolates	Feed samples	Colour on PDA	Colony growth at 25°C (mm)			Stage	Conidiophores	Conidia shape	Conidia size (µm)	Vesicle size (µm)	Hulle's cell	Species	GenBank	
			PDA	SAB	CZ								Accession number	ITS
SAAF 7	5	Black	55x57	60x65	66x67	A	Biseriate	Rough	4.6-5.7	55-70	-	<i>A. niger</i>	MK503962	
SAAF 12	8	Black	83x83	85x85	85x85	A	Biseriate	Rough	4.5-6	25-40	-	<i>A. niger</i>	MK503964	
SAAF 15	9	Black	79x81	80x82	83x84	A	Biseriate	Rough	4.6-5.8	30-45	-	<i>A. niger</i>	MK503966	
SAAF 14	7	Dark-brown	35x36	32x33	45x47	A	Biseriate	Smooth	3.5-4.1	20-40	-	<i>A. tubingensis</i>	MK503965	
SAAF 10	12	Black	80x80	85x85	85x85	A	Biseriate	Smooth	4-6	40-50	-	<i>A. awamori</i>	MK503963	
SAAF 4	7	Green	67x70	75x75	83x83	A	Biseriate	Smooth - finely rough	3.2-5.8	18-36	-	<i>A. flavus</i>	MK503960	
SAAF 17	10	Yellow-green	75x75	80x80	75x75	A	Biseriate	Smooth	5.3-7.2	25-40	-	<i>A. oryzae</i>	MK503967	
SAAF 6	2	Yellow	25x25	25x25	30x30	T	Uniseriate	Rough	4.3-6.5	20-25	+	<i>A. amstelodami</i>	MK503961	

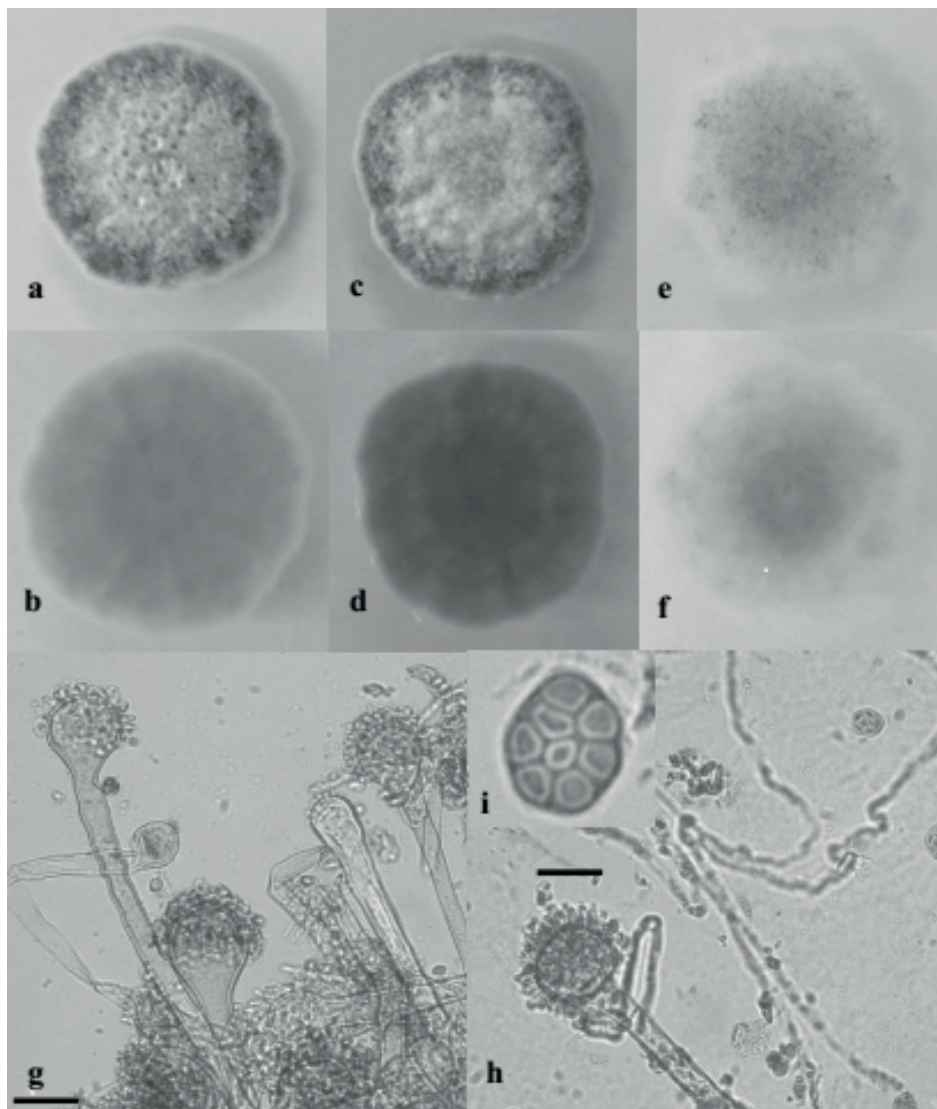


Figure 3. Macroscopic and microscopic features of *A. amstelodami* SAAF 6. 10 days- old colonies grown on PDA (a = F; b = R), SAB (c = F; d = R) and CZ (e = F; f = R); g, h) Conidiophores, vesicles and conidial head; i) ascus and ascospores. F = Front, R = Reverse. Bar: g, h, = 25 μ m; i = 10 μ m

Qualitative determination of the cellulolytic activity.

All *Aspergillus* strains showed cellulolytic activity, growing on the filter paper (table 4). In all the control tubes the filter paper was not altered. Strains *A. niger* SAAF 7, *A. awamori* SAAF 10 and *A. tubingensis* SAAF 14 shown the highest cellulolytic activity, completely macerating the paper at the end of the test. On the other hand, the temperature seems affects the cellulolytic capacity. At 25 °C the filter paper was generally less macerated, whereas *A. amstelodami* SAAF 6 showed cellulolytic activity only at this temperature. Agitation induced greater or lesser maceration of the filter paper depending on the *Aspergillus* strain.

Determinación cualitativa de la actividad celulolítica.

Todas las cepas de *Aspergillus* mostraron actividad celulolítica, creciendo en el papel de filtro (tabla 4). En todos los tubos de control no se alteró el papel de filtro. Las cepas *A. niger* SAAF 7, *A. awamori* SAAF 10 y *A. tubingensis* SAAF 14 mostraron la mayor actividad celulolítica, macerando completamente el papel al final de la prueba. Por otro lado, la temperatura pareció afectar la capacidad celulolítica. A 25 °C, el papel de filtro generalmente estaba menos macerado, mientras que *A. amstelodami* SAAF 6 mostró actividad celulolítica solo a esta temperatura. La agitación indujo una maceración mayor o menor del papel de filtro dependiendo de la cepa de *Aspergillus*.

Table. 4. Cellulolytic activity of eight *Aspergillus* strains, detected up to 21 days after inoculation at 25 and 30 °C in static (S) and shaking (Sh) condition.

Strains	25 °C S				30 °C S				30 °C Sh			
	5	10	15	21	5	10	15	21	5	10	15	21
<i>A. amstelodami</i> SAAF 6	1	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. awamori</i> SAAF 10	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	3	5
<i>A. flavus</i> SAAF 4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>A. tubingensis</i> SAAF 14	1	1	2	2	0	1	3	5	1	1	3	5
<i>A. niger</i> SAAF 7	1	1	1	1	1	3	4	5	1	1	3	5
<i>A. niger</i> SAAF 12	1	2	3	4	1	1	2	2	0	1	2	4
<i>A. niger</i> SAAF 15	1	1	1	1	1	2	2	3	1	1	1	1
<i>A. oryzae</i> SAAF 17	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	4

Discussion

In this study, for the first time, fourteen feed samples collected in two sampling area in a mill in Sicily were monitored to detect the presence of contaminating fungi. The level of fungal contaminations in all feed samples ranged from about 3 to 8 Log CFU/g with the recurrent presence of colonies belonging mostly to the ubiquitous genera *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, the main toxigenic molds. Between them *Fusarium* was the predominant genus isolated from samples, followed by *Aspergillus* and *Penicillium*, according with the results of other studies conducted in Italy and Europe (Chadd 2004, Covarelli *et al.* 2011 and Gregori *et al.* 2013). Moreover, the culture medium efficiency was also tested revealing differences in the estimation of fungal populations on the two utilized agar media. The universal medium PDA, ensuring the isolation of the highest number of fungal colonies, allow to assess the total fungal population, while to evaluate the *Aspergillus* population SAB should be preferred (Krnjaja *et al.* 2008). Regarding the two sampled area ours data showed no significantly differences, but the levels of total fungal contamination and above all the presence of toxigenic fungi revealed inappropriate techniques during the feed producing chain, indicating a low quality and bad treatment of the materials.

Usually, the population of these fungal contaminants in feed and food is strictly related to the relative concentrations in mycotoxins, in particular in bad-stored or long-exported materials (Dalcero *et al.* 1998, Krysinska-Traczyk *et al.* 2001, Gonzalez Pereyra *et al.* 2012 and Greco *et al.* 2014). On the contrary, in Sicilian raw materials and finished livestock feeds, despite the presence of these fungal contaminants, previous studies indicate that the dangerous metabolites (afla-, ochra- and *Fusarium*-toxins) resulted to be absent or detected at low level (Finoli and Vecchio 2003, Gallo *et al.* 2008 and Russo 2015). However, high level of fungal contaminants cause in feed and food the loss of nutritional value, due to their degradation by

Discusión

En este estudio, por primera vez, se monitorearon catorce muestras de pienso recolectadas en dos áreas de muestreo en un molino en Sicilia para detectar la presencia de hongos contaminantes. El nivel de contaminaciones fúngicas en todas las muestras de pienso varió de aproximadamente de 3 a 8 Log CFU/g con la presencia recurrente de colonias que pertenecen principalmente a los géneros ubicuos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, los principales mohos toxigénicos. Entre ellos, *Fusarium* fue el género predominante aislado de las muestras, seguido de *Aspergillus* y *Penicillium*, de acuerdo con los resultados de otros estudios realizados en Italia y Europa (Chadd 2004, Covarelli *et al.* 2011 y Gregori *et al.* 2013). Además, la eficacia del medio de cultivo también se probó revelando diferencias en la estimación de las poblaciones de hongos en los dos medios de agar utilizados. El PDA medio universal, que garantiza el aislamiento del mayor número de colonias de hongos, permite evaluar la población total de hongos, mientras que para evaluar la población de *Aspergillus* se debe preferir SAB (Krnjaja *et al.* 2008). Con respecto a las dos áreas muestreadas, nuestros datos no mostraron diferencias significativas, pero los niveles de contaminación fúngica total y, sobre todo, la presencia de hongos toxigénicos revelaron técnicas inapropiadas durante la cadena de producción de pienso, lo que indica baja calidad y mal tratamiento de los materiales.

Por lo general, la población de estos contaminantes fúngicos en piensos y alimentos está estrictamente relacionada con las concentraciones relativas en micotoxinas, en particular en materiales mal almacenados o exportados durante mucho tiempo (Dalcero *et al.* 1998, Krysinska-Traczyk *et al.* 2001, Gonzalez Pereyra *et al.* 2012 y Greco *et al.* 2014). Por el contrario, en materias primas sicilianas y piensos terminados para ganado, a pesar de la presencia de estos contaminantes fúngicos, estudios previos indican que los metabolitos peligrosos (toxinas afla, ochra y *Fusarium*) resultaron estar ausentes o detectados a bajo nivel (Finoli y Vecchio, 2003, Gallo *et al.* 2008 y Russo 2015). Sin embargo, el alto nivel de contaminantes fúngicos causa en los piensos y alimentos

enzymatic activity (Driehuis and Oude Elferink 2000, Megan *et al.* 2003, and Amigot *et al.* 2006).

Among the contaminating fungi, some species within the genus *Aspergillus* are the most critical for their mycotoxigenic and cellulolytic activity, causing a potential risk for animal and human health and for the degradation of trophic substance (Hanif *et al.* 2004 and Patyshakuliyeva 2016). The production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus* strains isolated from analysed feed samples was qualitatively evaluated. *A. niger*, *A. tubingensis* and *A. awamori* showed the highest expression level of cellulase enzymatic complex. On these basis, oat and poultry feed, the most contaminated livestock tested feeds, may have lost most of their organoleptic and nutritional quality.

As presented in the results, the highest cellulolytic activity is shown in the *Aspergillus* species that are part of the "Nigri section", in this case *A. niger*, *A. awamori* and *A. tubingensis*, the most used at the industrial level. These fungi, characterized by a high distribution worldwide, are also considered the most common fungi that occur in the decomposition of food (Raper and Fennell 1965) by the production of a great variety of enzymes, such cellulases, xylanases, proteases and phytases, mainly, and also α -amylases, pectinases, amyloglucosidases and lactases (Krishna 2005 and Aguiar, 2010). As regards the effect of temperature on the cellulolytic activity of microorganisms, a greater degradation rate was observed for most of the cases at 30°C. It is necessary to point out that temperature is one of the main factors that affect the biomass yield, an aspect that is closely related to the type of microorganism that is being tested. Each type of microorganism has a certain optimum growth temperature where it expresses its highest productivity. Temperatures close to this can also have a similar effect. Several authors propose optimum temperatures for the growth of different species of *Aspergillus* between 25-35 °C (Passamani *et al.*, 2014). On the other hand, temperature affects not only the growth of the biomass but also the production of different metabolites. Several authors have reported optimal temperatures for the production of cellulases in *Aspergillus* species between 30-35 °C (Bastawde 1992, Velkovska *et al.* 1997, Shahriarinnour *et al.*, 2011 and Saithi *et al.* 2016).

On the other hand, once the microorganisms have secreted their enzymes into the media, the enzymatic activity is conditioned by different factors such as pH, ionic strength, temperature, among others (Seager *et al.* 2016). These factors condition an optimal range of activity that varies depending on the type of enzyme. Although, in relation to temperature, an increase of this brings an increase in the speed of the reaction and consequently in the enzymatic activity (Voet *et al.* 2016). Regarding to the effect of the agitation, it is observed that at the end of the 21 days of experimentation all the strains with agitation, except in the case of *A.*

la pérdida de valor nutricional, debido a su degradación por la actividad enzimática (Driehuis and Oude Elferink. 2000, Megan *et al.* 2003 y Amigot *et al.* 2006).

Entre los hongos contaminantes, algunas especies dentro del género *Aspergillus* son las más críticas por su actividad micotoxigénica y celulolítica, causando un riesgo potencial para la salud animal y humana y para la degradación de la sustancia trófica (Hanif *et al.* 2004 y Patyshakuliyeva 2016). Se evaluó cualitativamente la producción de enzimas celulolíticas por cepas de *Aspergillus* aisladas de muestras de pienso analizadas. *A. niger*, *A. tubingensis* y *A. awamori* mostraron el nivel de expresión más alto del complejo enzimático de celulasa. Sobre esta base, los piensos de avena y para aves, los piensos para animales más contaminados, pueden haber perdido la mayor parte de su calidad organoléptica y nutricional.

Como se presenta en los resultados, la mayor actividad celulolítica se muestra en las especies de *Aspergillus* que forman parte de la "sección Nigri", en este caso *A. niger*, *A. awamori* y *A. tubingensis*, las más utilizadas a nivel industrial. Estos hongos, caracterizados por alta distribución en todo el mundo, también se consideran los hongos más comunes que ocurren en la descomposición de los alimentos (Raper y Fennell, 1965) por la producción de gran variedad de enzimas, tales como celulases, xilanasas, proteasas y fitasas, principalmente, y también α -amilasas, pectinasas, amiloglucosidasas y lactasas (Krishna 2005 y Aguiar 2010). En cuanto al efecto de la temperatura en la actividad celulolítica de los microorganismos, se observó mayor tasa de degradación en la mayoría de los casos a 30 °C. Es necesario señalar que la temperatura es uno de los principales factores que afectan el rendimiento de la biomasa, un aspecto que está estrechamente relacionado con el tipo de microorganismo que se está probando. Cada tipo de microorganismo tiene una cierta temperatura óptima de crecimiento donde expresa su mayor productividad. Las temperaturas cercanas a esta también pueden tener un efecto similar. Varios autores proponen temperaturas óptimas para el crecimiento de diferentes especies de *Aspergillus* entre 25-35 °C (Passamani *et al.* 2014). Por otro lado, la temperatura afecta no solo el crecimiento de la biomasa sino también la producción de diferentes metabolitos. Varios autores han informado temperaturas óptimas para la producción de celulases en especies de *Aspergillus* entre 30-35 °C (Bastawde 1992, Velkovska *et al.* 1997, Shahriarinnour *et al.*, 2011 y Saithi *et al.* 2016).

Por otra parte, una vez que los microorganismos han secretado sus enzimas en los medios, la actividad enzimática está condicionada por diferentes factores como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, entre otros (Seager *et al.* 2016). Estos factores condicionan un rango óptimo de actividad que varía según el tipo de enzima. Aunque, en relación con la temperatura, un aumento de esta trae un aumento en la velocidad de la reacción y, en consecuencia, en la actividad enzimática (Voet *et al.* 2016). Con respecto al efecto de la agitación, se observa que al final de los 21 días de experimentación,

niger, had a higher cellulolytic activity respect to those without agitation. This is mainly due to the fact that the agitated systems allow a greater interaction of the microorganism with the substrate, which allows a better colonization and use of the specific substrate surface that results in a greater production of enzymes. (Jeong *et al.* 2006).

In regard to the mycotoxigenic activity (not evaluated in this study), among the six identified *Aspergillus* species, *A. niger* and *A. flavus* are reported as agents of human and animal mycotoxicosis, the first associated with the production of ochratoxin A, and the second with aflatoxins B1 and B2 (Yu, 2012). However, not all the strains of these species are able to metabolize dangerous mycotoxins. As matter of fact, it is known that in *A. flavus* species only about 40-50 % of strains produce aflatoxins and only about 20 % of *A. niger* strains are ochratoxigenic (Abarca *et al.* 2001 and Davari *et al.* 2015). Although the detection of toxigenic fungi in the analyzed samples not necessarily indicate that mycotoxins are naturally occurring in the feed, it alerts to the potential risk of contamination. Other species isolated from feed samples, such as *A. awamori* and *A. oryzae*, not associated with the production of toxic metabolites, are largely used in food biotechnologies (Siedenberg *et al.* and 1998; Takagi 2014).

Conclusions

This first study on the evaluation of the level of fungal contamination in Sicilian raw materials and livestock showed the presence of *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* and *Fusarium spp.*, in the sampled materials. In particular, *Aspergillus* sections Nigri (*A. awamori*, *A. niger*, *A. tubingensis*), Flavi (*A. flavus*, *A. oryzae*) and Nidulantes (*A. amstelodami*) were identified by morphological and molecular methodologies. The production of cellulolytic enzymes was observed in all the *Aspergillus* strains, but *A. niger* SAAF 7, *A. awamori* SAAF 10 and *A. tubingensis* SAAF 14 shown the highest degradation activity.

On the basis of these results it is assumed that the most contaminated feed by these fungi can be the most degraded from a nutritional point of view.

This study highlights the importance of continued monitoring and control of fungal contamination in feed and food. Strategies aimed to prevent them in field, during storage and in all the feed production chain should be implemented. The control of this fungal contaminants and corrects techniques of animal feed production, in fact, can assure not only high level of animal's health but also high quality level of feeds both in palatability and nutritional values.

todas las cepas con agitación, excepto en el caso de *A. niger*, tenían mayor actividad celulolítica con respecto a aquellas sin agitación. Esto se debe, principalmente, al hecho de que los sistemas agitados permiten una mayor interacción del microorganismo con el sustrato, lo que permite mejor colonización y uso de la superficie específica del sustrato que resulta en mayor producción de enzimas. (Jeong *et al.* 2006).

Con respecto a la actividad micotoxigénica (no evaluada en este estudio), entre las seis especies de *Aspergillus* identificadas, *A. niger* y *A. flavus* se informan como agentes de micotoxicosis humana y animal, la primera asociada con la producción de ocratoxina A, y la segunda con las aflatoxinas B1 y B2 (Yu, 2012). Sin embargo, no todas las cepas de estas especies pueden metabolizar micotoxinas peligrosas. De hecho, se sabe que en las especies de *A. flavus* solo alrededor del 40-50 % de las cepas producen aflatoxinas y solo alrededor del 20 % de las cepas de *A. niger* son ocratoxigénicas (Abarca *et al.* 2001 y Davari *et al.* 2015).

Aunque la detección de hongos toxigénicos en las muestras analizadas no necesariamente indica que las micotoxinas se producen naturalmente en el pienso, estas alertan sobre el riesgo potencial de contaminación. Otras especies aisladas de muestras de piensos, como *A. awamori* y *A. oryzae*, no asociadas con la producción de metabolitos tóxicos, se utilizan en gran medida en biotecnologías alimentarias (Siedenberg *et al.* 1998 y Takagi 2014).

Conclusiones

Este primer estudio sobre la evaluación del nivel de contaminación por hongos en las materias primas y ganado sicilianos mostró la presencia de *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Fusarium spp.*, en los materiales muestreados. En particular, las secciones de *Aspergillus* Nigri (*A. awamori*, *A. niger*, *A. tubingensis*), Flavi (*A. flavus*, *A. oryzae*) y Nidulantes (*A. amstelodami*) se identificaron mediante metodologías morfológicas y moleculares. Se observó la producción de enzimas celulolíticas en todas las cepas de *Aspergillus*, pero *A. niger* SAAF 7, *A. awamori* SAAF 10 y *A. tubingensis* SAAF 14 mostraron la mayor actividad de degradación.

Sobre la base de estos resultados, se supone que el pienso más contaminado por estos hongos puede ser el más degradado desde el punto de vista nutricional.

Esta investigación resalta la importancia de un monitoreo y control continuo de la contaminación por hongos en los alimentos y piensos. Deben implementarse estrategias destinadas a prevenirlos en el campo, durante el almacenamiento y en toda la cadena de producción de piensos. El control de estos contaminantes fúngicos y corregir las técnicas de producción de piensos para animales, de hecho, puede asegurar no solo alto nivel de salud del animal sino también alto nivel de calidad de los piensos, tanto en palatabilidad como en valores nutricionales.

References

- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R. & Cabanes, F.J. 2001. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus spp.* J. Food Prot. 64 (6): 903-906. doi:10.4315/0362-028x-64.6.903.
- Adhikari, A., Sen, M., Gupta-Bhattacharya, S. & Chanda, S. 2004. Airborne viable, non-viable, and allergenic fungi in a rural agricultural area of India: a 2-year study at five outdoor sampling stations. Sci. Total Environ. 326 (1-3): 123-141. doi: 10.1016/j.scitotenv.2003.12.007.
- Aguiar, C.M. 2010. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. PhD Thesis. Brasil: Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
- Altschul, S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D. J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215 (3): 403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Amigot, S.L., Fulgueira, C.L., Bottai, H. & Basílico, J.C. 2006. New parameters to evaluate forage quality. Postharvest. Biol. Tec. 41(2): 215-224. . doi:10.1016/j.postharvbio.2006.03.004
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd Ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, 241 p.
- Bastawde, K.B. 1992. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. World J. Microbiol. and Biotech. 8: 45-49. doi:10.1007/BF01200683.
- Chadd, S. 2004. Mycotoxigenic challenges to European animal production: a review. In: 55th Annual Meeting of the EAAP, in Adamovi M., Bočarov-Stančić A., Đorđević N., Daković A., Adamović I. (2005): Mycotoxins in the silage-causes of creating, aftermath and protection from acting. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke. 108: 51-57.
- Cole, G.T. & Kendrick, B. 1989. Biology of Conidial Fungi. 1st Ed. Academic Press, New York, 486 p.
- Covarelli, L., Beccari, G. & Salvi, S. 2011. Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. Food Chem. Toxicol. 49: 2365-2369. doi: 10.1016/j.fet.2011.06.47.
- Dalcerio, A., Magnoli, C., Luna, M., Ancasi, G., Reynoso, M.M., Chiacchiera, S., Miazzi, R. & Palacio, G. 1998. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. Mycopathologia 141(1): 37-43. doi: 10.1023/A:1006868002985.
- Davari, E., Mohsenzadeh, M., Mohammadi, Gh. & Rezaei-Doloei, R. 2015. Characterization of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* strain isolates from animal feedstuffs in northeastern Iran. Iran. J. Vet. Res. 16 (2): 150-155. doi:10.22099/ijvr.2015.3037.
- Driehuis, F. & Oude Elferink, S.J.W.H. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. Vet. Q. 22 (4): 212-216. doi:10.1080/01652176.2000.9695061.
- Finoli, C. & Vecchio, A. 2003. Occurrence of aflatoxins in feedstuff, sheep milk and dairy products in Western Sicily. Italian J. Animal Sci. 2(3) : 191-196. doi:10.4081/ijas2003.191.
- Gallo, G., Lo Bianco, M., Bognanni, R. & Saimbene, G., 2008. Mycotoxins in durum wheat grain: hygienic-health quality of sicilian production. J. Food Sci. 73(4):42-47. doi:10.1016/j.jfs.2008.07.04.X.
- Gardes, M. & Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol. 2: 113-118.
- Ghorbani, F., Karimi, M., Biri, D., Kariminia, A. & Jeihanipour, A., 2015. Enhancement of fungal delignification of rice straw by *Trichoderma viride* to improve its saccharification. Biochem. Eng. J. 101 (15): 77-84. doi:10.1016/j.bej.2015.05.003.
- Godfray, H.C.J., Mason-D'Croz, D. & Robinson, S. 2016. Food system consequences of a fungal disease epidemic in a major crop. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1709: 371.
- Gonzalez Pereyra, M.L., Chiacchiera, S.M., da Rocha Rosa, C.A., Sager, R., Dalcerio, A.M. & Cavaglieri, L.R. 2012. Fungal and mycotoxin contamination in mixed feeds: evaluating risk in cattle intensive rearing operations (feedlots). Rev. Bras. Med. Vet. 34(4): 311-318. doi:10.1098/rstb.2015.0467.
- Greco, M.V., Franchi, M.L., Golba, S.L.R., Pardo, A.G. & Pose, G.N. 2014. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in poultry feed for food-producing animals. Scientific World Journal. 1-9. doi:10.1155/2014/968215.
- Gregori, R., Meriggi, P., Pietri, A., Formenti, S., Baccarini, G. & Battilani, P. 2013. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. Food Control 30: 280-287. doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.033.
- Hanif, A., Yasmeen, A. & Rajoka, M.I. 2004. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. Biores Technol. 94:311-319. doi:10.1016/j.biotech.2003.12.013
- Jeong, C., Chakrabarty, D., Hahn, E.J., Lee, H.L. & Paek K.Y. 2006. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. Biochem. Eng. J. 27(3): 252-263. doi:10.1016/j.2005.08.025.
- Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. The Netherlands, Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 116 p.
- Krishna, C. 2005. Solid State Fermentation Systems - An Overview. Critical Reviews in Biotechnology., 25: 1-30. doi:10.1080/07388550590925383.
- Krnjaja, V., Stojanovic, Lj., Cmiljanic, D., Trenkovski, S. & Tomasevic, D. 2008. The presence of potentially toxigenic fungi in poultry feed. Biotechnol. Anim. Husb. 24 (5-6): 87-93. doi:10.2298/BA0806087K.
- Krysinska-Traczyk, E., Keicana, I., Perkowski, J. & Dutkiewicz, J. 2001. Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms in Eastern Poland. Ann. Agric. Environ. Med. 8 : 269-274.
- Lin, M.T. & Dianese, J.C. 1976. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxins production by *Aspergillus spp.* Phytopathology, 66, 1466-69. doi:10.1094/Phyto-66-1466.
- Maina, A., Wagacha, J., Mwaura, F., Muthomi, J. & Woloshuk, C. 2016. Postharvest practices of maize farmers in Kaiti district, Kenya and the impact of hermetic storage on populations of *Aspergillus spp.* and aflatoxin contamination. J. Food Res.

- 5(6): 53-62. doi:10.5539/jfr.v5n6p53.
- Mandels, M., Andreotti, R. & Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioengng. Syrup.* 6:21-33. doi:10.1186/1754-6834-2-21.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. & Albersheim, P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 625-663. doi:10.1146/annurev.bl.53070184.003205.
- Megan, N., Hope, R., Cairns, V. & Aldred, D. 2003. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Eur. J. Plant. Pathol.* 109: 723-730. doi:10.1023/A:1026082425177.
- Passamani, F.R., Hernandez, T., Lopes, N.A., Bastos, S.C., Santiago, W.D., Cardoso, M.D. & Batista, L.R. 2014. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *J. Food Prot.* 77(11):1947-52. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-495.
- Patyshakuliyeva, A., Arentshorst, M., Allijn, I.E. & Ram, A.F.J. 2016. Improving cellulase production by *Aspergillus niger* using adaptive evolution. *Biotechnol. Lett.* 38: 969. doi:10.1007/s10529-016-2060-0.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 1999. *Fungi and food spoilage*. 2nd Ed. Aspen publication, Gaithersburg, 576 p.
- Prasad, R., Souri, S., Sharma, A. K., Sharma, G. & Merera, C. 2016. Contaminants and toxins in foods and feeds. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2(1): 82-89.
- Raper, K.B & Fennell, D.I. 1965. *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 686 p.
- Russo G., 2015. Progetto SISACER. Report tecnico sul monitoraggio del contenuto in micotossine in campioni di grano duro siciliano. 10.13140/RG.2.1.1579.5604. Soluzioni Innovative per la Sicurezza Alimentare nella filiera CERealicola (S.I.S.A.C.E.R.)- CUP: G63F11000560004 Ente finanziatore: Assessorato Attività Produttive della Regione Siciliana Responsabile scientifico Prof. Agatino Russo (Università degli Studi di Catania) Soggetto attuatore del monitoraggio del contenuto in Micotossine: Consorzio di Ricerca Gian Pietro Ballatore Referente scientifico per il monitoraggio delle micotossine: dott. Giuseppe Russo.
- Seager, S., Slabaugh, M & Hansen, M. 2016. *Chemistry for Today: General, Organic, and Biochemistry* (9th ed.). Cengage Learning. 960p.
- Saithi, S., Borg, J., Nopharatana, M., & Tongta, A. 2016. Mathematical Modeling of Biomass and Enzyme Production Kinetics by *Aspergillus niger* in Solid-State Fermentation at Various Temperatures and Moisture Contents., *Journal of Microbial & Biochemical Technology.* 8(2): 123-130. doi:10.4172/1948-5948.1000274.
- Shahriarinnour, M., Wahad, M.N., Ariff, A. B., Mustafa, S., & Mohama, R.. 2011. Kinetics of cellulase production by *Aspergillus terreus* at various levels of dissolved oxygen tension in a stirred tank bioreactor., *BioResources.* 6 (4): 4909-4921.
- Siedenberg, D., Gerlach, S.R., Schuglerl, K., Giuseppin, M.L.F. & Hunik, J., 1998. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochem.* 33(4): 429-433. doi:10.1016/S0032-9592(97)00090-3.
- Takagi, S., 2014. *Koji mold (Aspergillus oryzae)*. AccessScience, McGraw-Hill Education. doi:10.1036/1097-8542.400130.
- Thathana, M.G., Murage, H., Abia, A.L.K. & Pillay, M. 2017. Morphological characterization and determination of aflatoxin-production potential of *Aspergillus flavus* isolated from Maize and Soil in Kenia. *Agriculture* 7(10): 80. doi:10.3390/agriculture71000080.
- Tian, C., Beeson, W.T., Iavarone, A.T., Sun, J., Marletta, M.A., Cate, J.H. & Glass, N.L. 2009. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106: 22157-22162.
- Torta, L., Lo Piccolo, S., Piazza, G., Burrano, S., Colombo, P., Ottonello, D., Perrone, R., Di Maida, G., Pirrotta, M., Tomasello, A. & Calvo, S. 2015. *Lulwoana sp.*, a dark septate endophyte in roots of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seagrass, *Plant. Biol.* 17(2): 505-11. doi:10.1111/plb.12246.
- Velkovska, S., Marten, M.R., and Ollis, D. F. 1997 Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30., *SF J. Biotechnol.* 54: 83-94. doi:10.1016/S0168-1656(47)01669-6.
- Voet, D., Voet, J. & Pratt, C. 2016. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level* (5th ed.). Wiley.
- Volkel, I., Schröer-Merker, E. & Czerny, C.P. 2011. The Carry-Over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European Food Safety Legislation. *Food Nutr. Sci.* 2: 852-867. doi:10.4236/fns.2011.28117.
- von Arx, J.A. 1981. *Genera of fungi sporulating in culture*. 3rd Ed. Cramer, Lichtenstein, 424 p.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and application*. Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sminsky, J. J. And White, T. J. Eds. P315-322. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- Whitlow, L.W., Hagler, Jr. & Diaz, D.E. 2010. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs.* 14: 74-84.
- Wilson, D.B. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* 14: 259-263. doi:10.1016/j.mib.2011.04.004.
- Yu, J. 2012. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins.* 4: 1024-1057. doi:10.3390/toxins4111024.