

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA, OSIJEK  
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ, ZAGREB

POSLIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI INTERDISCIPLINARNI DOKTORSKI STUDIJ  
ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

Gabriella Kanižai Šarić

**UTJECAJ SMJESA ANTIOKSIDANASA I MASNIH KISELINA NA  
RAST *FUSARIUM* SP. PRODUCENATA TRIHOTECENA I  
FUMONIZINA U KRMNIM SMJESAMA**

Doktorski rad

OSIJEK, 2010

POSILIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI INTERDISCIPLINARNI DOKTORSKI STUDIJ  
ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

Gabriella Kanižai Šarić

**UTJECAJ SMJESA ANTIOKSIDANASA I MASNIH KISELINA NA  
RAST *FUSARIUM* SP. PRODUCENATA TRIHOTECENA I  
FUMONIZINA U KRMNIM SMJESAMA**

Doktorski rad

Povjerenstvo za obranu doktorskog rada:

Dr. sc. Božena Čosović, znanstvena savjetnica – predsjednica

Dr. sc. Zlata Milaković, redovita profesorica – komentorka i članica

Dr. sc. Tomislav Klapac, redoviti profesor – mentor i član

Dr. sc. Draženka Jurković, redoviti profesor – zamjena člana

OSIJEK, 2010

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek  
Institut Ruder Bošković, Zagreb

Doktorski rad

Poslijediplomski sveučilišni interdisciplinarni doktorski studij Zaštita prirode i okoliša

**UDK:**

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

### UTJECAJ SMJESA ANTIOKSIDANASA I MASNIH KISELINA NA RAST *FUSARIUM* SP. PRODUCENATA TRIHOTECENA I FUMONIZINA U KRMNIM SMJESAMA

(Gabriella Kanižai Šarić, dipl. ing.)

**Rad je izrađen:** Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek i Poljoprivredni fakultet, Osijek

**Mentor:** Dr. sc. Tomislav Klačec, red. prof.

Gljive roda *Fusarium* sp. česti su kontaminanti žitarica i stočne hrane. Mikotoksini koje sintetiziraju pripadaju, između ostalih, u skupinu trihotecena i fumonizina. Kako bi se izbjegla štetna djelovanja ovih gljiva i mikotoksina koje produciraju na zdravlje životinja, a konzumacijom proizvoda animalnog podrijetla i zdravlje ljudi, moguće je stočnu hranu obogatiti tvarima antifungalnih i antimikotoksikogenih osobina. Stoga je u ovom radu istražen utjecaj smjesa tvari sintetskih antioksidanasa (butilirani hidroksianisol, propil paraben, butilirani hidrokistoluen i dr.), prirodnih antioksidanasa (timol, eugenol, karvakrol i dr.) i masnih kiselina (oktanska, dekanska, dodekanska i dr.) na rast *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioides* na krmnim smjesama PPT-2 i SK-D-N pri dvije razine aktiviteta vode (0,95 i 0,98). Ispitan je i učinak smjesa tvari na biosintezu trihotecena tipa B (DON, 3-AcDON, 15-AcDON, NIV) i fumonizina B1 i B2. Smjese tvari butiliranog hidroksianisola, timola i propil parabena djelotvorno inhibiraju radikalni rast *F. graminearum* i *F. verticillioides*. Značajna inhibicija sinteze fumonizina pri aw 0,98 ostvarena je samo u smjesi s dodatkom masnih kiselina, dok nijedna ispitana kombinacija tvari nije uspješno inhibirala sintezu trihotecena tipa B. Rezultati ukazuju na niz činioca (od abiotskih uvjeta, sastava krmiva do osobina plijesni) koje treba uzeti u obzir kod formuliranja kombinacija optimalnog supresivnog učinka u uvjetima skladištenja.

**Broj stranica:** 135

**Broj slika:** 59

**Broj tablica:** 46

**Broj literaturnih navoda:** 226

**Broj priloga:** 1

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, krmne smjese, trihoteceni tipa B, fumonizini B, sintetski antioksidansi, prirodni antioksidansi, masne kiseline

**Datum obrane:** 19.03.2010.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Dr. sc. Božena Čosović, znan. savj.
2. Dr. sc. Zlata Milaković, red. prof.
3. Dr. sc. Tomislav Klačec, red. prof.
4. Dr. sc. Draženka Jurković, red. prof.

**Rad je pohranjen u:**

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb.; Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14; Sveučilištu u Rijeci, Riječke rezolucije 7, Sveučilištu u Splitu, Livanjska 5 i Sveučilištu u Osijeku, trg Sv. Trojstva 3

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University Josip Juraj Strossmayer, Osijek  
Institute Ruđer Bošković, Zagreb  
University postgraduate interdisciplinary study  
Environmental Protection and Nature Conservation

PhD thesis

**UDK:**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Agriculture

**INFLUENCE OF MIXTURES OF ANTIOXIDANTS AND FATTY ACIDS ON THE GROWTH OF  
*FUSARIUM* SP. PRODUCERS OF TRICHOHECENES AND FUMONISINS IN FODDER MIXTURES**

(Gabriella Kanižai Šarić, BSc)

**Thesis performed at:** Faculty of Food Technology, Osijek and Faculty of Agriculture, Osijek

**Supervisor:** Prof. Tomislav Klačec

Fungi of genus *Fusarium* sp. are frequent contaminants of cereals and fodder. Mycotoxins that they synthesize belong, among others, to the group of trichothecenes and fumonisins. In order to avoid harmful action of these fungi and mycotoxins they produce on animal's health, and on human health through consumption of products of animal origin, fodder can be enriched by antifungal and antimycotoxinogenic compounds. Therefore, this study investigated influence of mixtures of synthetic antioxidants (butylated hydroxyanisol, propyl paraben, butylated hydroxytoluen etc.), natural antioxidants (thymol, eugenol, carvacrol etc.) and fatty acids (octanoic, decanoic, dodecanoic etc.) on the growth of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* in fodder mixtures PPT-2 and SK-D-N at two different water activities (0,95 and 0,98). Influence of mixtures on trichothecenes type B (DON, 3-AcDON, 15-AcDON, NIV) and fumonisins B1 and B2 biosynthesis was also investigated. Mixtures of butylated hydroxyanisol, thymol and propyl paraben efficiently inhibited radial growth of *F.graminearum* and *F.verticillioides*. Significant fumonisins synthesis inhibition at aw 0,98 was determined only in mixture with addition of fatty acids, while none of investigated combinations of compounds successfully inhibited trichothecenes type B synthesis. Results indicate variety of factors (from abiotic conditions, fodder content to mould characteristics) that should be taken into account when formulating combination with optimal suppressive effect in storage conditions.

**Number of pages:** 135

**Number of figures:** 59

**Number of tables:** 46

**Number of references:** 226

**Number of appendices:** 1

**Original in:** Croatian

**Key words:** *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, fodder mixtures, trichothecenes type B, fumonisins B, synthetic antioxidants, natural antioxidants, fatty acids

**Date of the thesis defense:** 19.03.2010.

**Reviewers:**

1. Božena Čosović, PhD
2. Prof. Zlata Milaković
3. Prof. Tomislav Klačec
4. Prof. Draženka Jurković

**Thesis deposited:**

National and University Library, Zagreb, Hrvatske bratske zajednice bb., University of Zagreb, Trg maršala Tita 14; University of Rijeka, Riječke rezolucije 7, University of Split, Livanjska 5 and University of Osijek, trg Sv. Trojstva 3

Veliko hvala prof. dr. sc. Zlati Milaković na ukazanom povjerenju, nesebičnoj pomoći, podršci i razumijevanju u svakodnevnom radu.

Prof. dr. sc. Tomislavu Klapetu veliko hvala na svim konstruktivnim savjetima, sugestijama, te na pomoći pri izradi i pisanju ovoga rada.

Dr. sc. Boženi Ćosović hvala na svim konstruktivnim prijedlozima.

Hvala kolegama s Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku na pomoći i savjetima.

Hvala dragim kolegama s Poljoprivrednog fakulteta te svima drugima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovoga rada.

Veliku zahvalnost upućujem i mojoj obitelji, posebice suprugu Marinku, za svakodnevnu podršku i razumijevanje.

Izrada doktorske disertacije je najvećim dijelom financirana tehnološkim projektom „Recepture krmiva otpornijih na rast plijesni i sintezu mikotoksina“ (TP-04/0113-08).

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	3
2.1. Značajni fitopatogeni predstavnici roda <i>Fusarium</i> .....	4
2.1.1. Fitopatogenost <i>Fusarium graminearuma</i> .....	5
2.1.2. Fitopatogenost <i>Fusarium verticillioidesa</i> .....	6
2.2. Mikotoksini .....	6
2.2.1. Trihoteceni tipa B.....	7
2.2.1.1. Toksičnost.....	9
2.2.2. Fumonizini (B).....	11
2.2.2.1. Toksičnost.....	11
2.2.3. Strategije prevencije nastanka i dekontaminacije mikotoksina.....	14
2.2.3.1. Mogućnosti nastanka mikotoksina u uskladištenom materijalu.....	16
2.2.3.1.1. Optimalni abiotski uvjeti rasta <i>Fusarium</i> sp. ....	18
2.2.3.2. Antioksidansi.....	18
2.2.3.2.1. Sintetski antioksidansi i mehanizam djelovanja.....	19
2.2.3.2.2. Prirodni antioksidansi i mehanizam djelovanja.....	22
2.2.3.3. Masne kiseline i mehanizam djelovanja.....	28
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	32
3.1. Čiste kulture rodova <i>Fusarium</i> .....	33
3.2. Krmne smjese.....	33
3.3. Antioksidansi i masne kiseline.....	34
3.4. Priprema smjese antioksidanasa i masnih kiselina.....	35
3.5. Umješavanje antifungalnih smjesa tvari u krmne smjese.....	35
3.6. Inokulacija krmnih smjesa.....	35
3.7. Inkubacija krmnih smjesa.....	36
3.8. Određivanje mikotoksina.....	36
3.8.1. Analiza trihotecena tipa B.....	36
3.8.1.1. Prečišćavanje SPE kolonama.....	37
3.8.1.2. HPLC uvjeti.....	37
3.8.2. Analiza fumonizina.....	37
3.8.2.1. Prečišćavanje imunoafinitetnim kolonama.....	37
3.8.2.2. Derivatizacijska reakcija i HPLC uvjeti.....	38

3.9. Statistička obrada podataka.....	39
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
4.1. Rast <i>Fusarium graminearuma</i> na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,95.....	41
4.2. Rast <i>Fusarium graminearuma</i> na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98.....	52
4.3. Rast <i>Fusarium graminearuma</i> na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,95.....	58
4.4. Rast <i>Fusarium graminearuma</i> na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98.....	59
4.5. Rast <i>Fusarium verticillioidesa</i> na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,95.....	61
4.6. Rast <i>Fusarium verticillioidesa</i> na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98.....	72
4.7. Rast <i>Fusarium verticillioidesa</i> na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,95.....	77
4.8. Rast <i>Fusarium verticillioidesa</i> na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98.....	78
4.9. Odabrane kombinacije antifungalnih tvari za određivanje trihotecena tipa B u krmnim smjesama.....	79
4.9.1. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi PPT-2.....	82
4.9.2. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi SK-D-N.....	84
4.10. Odabrane kombinacije antifungalnih tvari za određivanje FB1 i FB2 u krmnim smjesama.....	85
4.10.1. FB1 i FB2 u krmnoj smjesi PPT-2.....	88
4.10.2. FB1 i FB2 u krmnoj smjesi SK-D-N.....	90
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>91</b>
5.1. Učinkovitost kombinacija i koncentracija antifungalnih tvari na rast <i>Fusarium graminearuma</i> .....	92
5.2. Učinkovitost kombinacija i koncentracija antifungalnih tvari na rast <i>Fusarium verticillioidesa</i> .....	97
5.3. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi PPT-2 i SK-D-N.....	102
5.4. Fumonizini B1 i B2 u krmnoj smjesi PPT-2 i SK-D-N.....	105

<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>108</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>112</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>132</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>134</b>



## **1. UVOD**

Plijesni roda *Fusarium* jedni su od najčešćih kontaminanata žitarica u poljoprivrednoj proizvodnji u agroekološkim uvjetima Republike Hrvatske. *Fusarium* sp. metaboliziraju preko 100 sekundarnih toksičnih metabolita – mikotoksina koji mogu izazvati akutna i kronično toksična djelovanja na ljude i životinje. Kontaminacija usjeva *Fusarium* vrstama može nastati prije žetve (na polju), ali i poslije žetve (u skladištima i silosima). Kako bi se izbjegla štetna djelovanja patogenih gljiva i mikotoksina na zdravlje životinja, te konzumacijom proizvoda animalnog podrijetla, i zdravlje ljudi, neophodno je uskladištene materijale (stočnu hranu) zaštititi od kontaminacije plijesnima i mikotoksinima. Strategija nadzora fungalnog porasta i biosinteze mikotoksina, između ostaloga, obuhvaća i korištenje kemijskih i prirodnih konzervanasa u skladištima i silosima, pri čemu ova druga skupina prema nekolicini prethodnih i u ovom istraživanju uključuje: antioksidanse, eterična ulja i masne kiseline. Antioksidansi imaju sposobnost usporavanja ili sprječavanja oksidacije drugih molekula, te se i inače dodaju stočnoj hrani kako bi se spriječilo njeno kvarenje. Niz ispitivanja potvrđuje opću antimikrobnu, antifungalnu i antimikotoksikogenu djelotvornost različitih sintetskih i prirodnih antioksidanasa (Ahmand i sur., 1981; Lin i sur., 1983; Moleyar i sur., 1986; Paster i sur., 1990; Thompson, 1992; Elgayyar i sur., 2001; Etcheverry i sur., 2002; Juglal i sur., 2002; Marin i sur., 2003; Nesci i sur., 2003; Velluti i sur., 2004; Torres i sur., 2003; Lopez i sur., 2004; Marin i sur., 2004). Eterična ulja i pojedini njihovi sastojci su antimikrobne tvari prirodnog podrijetla što bi moglo podrazumjevati veću sigurnost za ljude i okoliš (Dafarera i sur., 2003). Potvrđeno je također kako pojedine masne kiseline posjeduju antifungalna svojstva (Bergsson i sur., 2001; Riháková i sur., 2002; Walters i sur., 2003), pri čemu izvori masnih kiselina mogu biti prirodnog podrijetla, kao npr. kokosovo ulje, ulje muškarnog oraščića, cimetovo ulje, ulje palminih koštica (Gunstone i sur., 1994; Ghosh i sur., 1997; Spricigo i sur., 1999). Prema dostupnim literaturnim navodima antifungalna i antimikotoksikogena djelotvornost antioksidanasa, eteričnih ulja i masnih kiselina nije ispitana na krmnim smjesama. Ovakva istraživanja su neophodna kako bi se definirali učinkoviti uvjeti primjene ovih tvari obzirom na različite uvjete okolišne vlage, temperature, pH te kemijski sastav stočne hrane i sličnih supstrata što je, između ostaloga, i bio cilj ovog ispitivanja.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Značajni fitopatogeni predstavnici roda *Fusarium*

Rod *Fusarium* ubrajamo u pododjel *Deuteromycotina*, razred *Hyphomycetes*, red *Hyphales* dok spolni stadiji, ako je poznat, pripada pododjelu *Ascomycotina*, razredu *Pyrenomycetes*, redu *Hypocreales*. Ovaj rod uzročnika biljnih bolesti karakterizira globalna rasprostranjenost, parazitiraju na velikom broju kultiviranih i korovnih vrsta biljaka (Ćosić i sur., 2004) i imaju kozmopolitsku distribuciju u tlu i na organskim supstratima (Ćosić i sur., 2008). Najveće štete čine na najsjajnijim, a time i najbitnijim usjevima Republike Hrvatske: pšenici i kukuruzu. Pšenica je naša najvažnija krušarica, ali je i bitna sirovina za prehrambenu industriju (brašno, kruh, pecivo tjestenina, keksi), dok je kukuruz također bitna prehrambena namirnica (kruh, palenta, tortilje, corn-flakes) i sirovina za prehrambenu industriju (industrija škroba, alkoholnih pića i dr.). Osim toga, žitarice malog zrna (pšenica, ječam) kao i kukuruz predstavljaju bitan izvor energije i proteina za sve vrste domaćih životinja (Placinta i sur., 1999). Kako su ove žitarice, ovisno o klimatskim prilikama, više ili manje receptivne na infekcije rodom *Fusarium*, potrebno je poznavati i razumijeti puteve poljske zaraze. Osim toga trebamo biti svjesni i kontaminacije s mikotoksinima koje ovaj rod metabolizira s ciljem što uspješnije antifungalne i antimikotoksikogene prevencije.

*Fusarium* vrste identificirane u sedmogodišnjem praćenju (1996-2002 g.) ovog patogenog roda na području istočne Hrvatske, uključuju *F. graminearum* kao dominantnu vrstu izoliranu sa svih dijelova biljke pšenice, dok su se ostale vrste javile u znatno manjem postotku: *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. oxysporium*, *F. solani*, *F. sporotrichoides*, *M. nivale* (Ćosić i sur., 2004). Sličnim monitoringom utvrđeno je da na zrnima i stabljikama kukuruza prevladava *F. verticillioides*, dok je na ostacima korijena i stabljika kukuruza dominirao *F. graminearum* uz rjeđu prisutnost *F. subglutinans*, *F. culmorum*, *F. oxysporium* i *F. sporotrichoides* (Ćosić i sur., 1999; Ćosić i sur., 2004; Cvetnić i sur., 2005).

Iz navedenog je vidljivo kako je u agroekološkim uvjetima Hrvatske najfrekventnija pojavnost *Fusarium graminearum* Schw. i *Fusarium verticillioides* Sacc., koji mogu drastično umanjiti prinose i kvalitetu zrna i financijski ugroziti poljoprivredne proizvođače, i izazvati poskupljenje sirovina i glavnih prehrambenih artikala (kruh, brašno). Osim financijskog rizika postoji, potencijalno značajniji, zdravstveni rizik. Navedeni patogeni imaju sposobnost akumulacije u zrnu otrovnih produkata svoga metabolizma – mikotoksina, koji mogu ugroziti zdravlje ljudi i životinja koju takvu hranu konzumiraju.

### 2.1.1. Fitopatogenost *Fusarium graminearum*

*Fusarium graminearum* Schwabe teleomorf: *Gibberella zeae* (Schweintz) Petch sin. *F. roseum* Lk. emend Snyder and Hans. "*Graminearum*" (Snyder and Hansen) je uzročnik truleži korijena, paleži klijanaca, paleži klasova pšenice i ječma (McMullen i sur., 1997; Ćosić, 1997; Wang i sur., 2006; Osborne i sur., 2007). Najveće ekonomske štete nastaju pojavom paleži klasova na pšenici. Najdominantnija identificirana vrsta u paleži klasova pšenice i drugih žitarica malog zrna u mediteranskoj regiji je *F. graminearum*, a slijede manje učestale izolirane vrste: *F. poae*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* i *F. tricinctum*. Ostale, sporadično izolirane vrste uključuju *F. acuminatum*, *F. subglutinans*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (Logrieco i sur., 2003; Osborne i sur., 2007; Ćosić i sur., 2007).

*F. graminearum* je glavni uzročnik truleži korijena i vlati te paleži klasova pšenice u Hrvatskoj (Ćosić, 1997). Desetogodišnjim praćenjem (1996-2005 g.) pojavnosti ovog patogena *F. graminearum* je izoliran iz 51% uzoraka zrna pšenice (*F. verticillioides* je izoliran iz 18% uzoraka, *F. avenaceum* u 14%, *F. subglutinans* u 12%) i iz 41% uzoraka zrna ječma (u 18% je nađen *F. verticillioides*, u 16% *F. subglutinans* i u 13% *F. avenaceum*) (Ćosić i sur., 2007). Pojavom paleži klasova prekida se zrioba i nalijevanje zrna pa su zrna mala, štura i smežurana, što za posljedicu ima drastično smanjenje kvalitete zrna i prinosa ove krušne žitarice. Osim toga dolazi i do nakupljanja mikotoksina u samom zrnu, što povećava rizik od mikotoksikoza. Palež klasova se posebice javlja u područjima s visokim temperaturama i visokom relativnom vlažnosti ili čestim oborinama tijekom klasanja ili cvjetanja (Logrieco i sur., 2003). Istraživanja u Hrvatskoj su pokazala češću pojavnost fuzarijske paleži klasova u godinama kada u vrijeme cvjetanja vladaju visoke temperature (iznad 25°C), uz relativnu vlažnost zraka iznad 85% (Tomasović i sur., 1991). Ova tema je predmet mnogih znanstvenih istraživanja posljednjih godina kojima se nastoji upoznati ekologija patogena i efikasno umanjiti putove inokuluma i infekcije kroz agrotehničke zahvate, sjetvu otpornijih sorti (hibrida), uporabu zaštitnih sredstava (fungicida, insekticida, herbicida) i anifungalnih agenasa (McMullen i sur., 1997; Logrieco i sur., 2003; Yuen i sur., 2007; Osborne i sur., 2007).

Nadalje, nekoliko *Fusarium* rodova, uključujući i *Fusarium graminearum*, predstavlja široko raširene patogene na kukuruзу u umjerenom i subtropskom području uključujući i europska područja uzgoja kukuruza (Logrieco i sur., 2002), uzrokujući palež klijanaca, trulež korijena, stabljike i klipa (Vigier i sur., 2001; Logrieco i sur., 2002; Ćosić i sur., 2004).

Dominantne vrste koje uzrokuju tzv. „crvenu trulež klipova“ su *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* (sin. *F. crookwellense*) i *F. avenaceum* (teleomorf *G. avenacea*) (Logrieco i sur., 2002). Trulež klipova se javlja u godinama s puno oborina i nižim temperaturama tijekom ljeta i rane jeseni (Ellend i sur., 1997; Bottalico, 1998). Ovaj fitopatogen je također veliki ekonomski štetnik koji umanjuje kvalitetu zrna, smanjuje prinos i dovodi do nagomilavanja mikotoksina u zrnu posebice deoksinivalenola i zearalenona.

### **2.1.2. Fitopatogenost *Fusarium verticillioides***

*Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg teleomorf: *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. Kimura) sin. *F. moniliforme* Sheld. (*Gibberella fujikuroi* (Sawada.) Wollenw.) je iz ekonomskih razloga bitan patogen na kukuruзу (*Zea mays* L.) i odgovoran je za značajne gubitke prinosa i kvalitete zrna (Warfield i sur., 1999). Ovaj fitopatogen je uzročnik truleži klipa i zrna kukuruza (Munkvold, 2003; Clements i sur., 2004). Osim spomenute „crvene truleži klipa kukuruza“ koju uzrokuje *F. graminearum*, trulež klipa može nastati i infekcijom *F. verticillioides* i tada se naziva „ružičasta truleži klipa“. Ova trulež klipova se javlja u sušim i toplijim područjima (Bottalico, 1998; Munkvold, 2003) za razliku od tzv. „crvene truleži klipa“. Vrste koju su najčešće izolirane s kukuruza oboljelog od „ružičaste truleži klipa“ je uobičajeno *G. fujikuroi* i njegov anamorf *F. verticillioides*, *F. proliferatum* i *F. subglutinans* (Logrieco i sur., 2003). Prema ispitivanju Ćosić i Jurković (2001) i Ćosić i sur. (2004), dominantna vrsta na zrnu kukuruza u RH je *F. verticillioides*, zatim *F. subglutinans* i *F. graminearum*. *F. verticillioides* je izoliran iz 43%, *F. subglutinans* iz 32%, a *F. graminearum* iz 20% uzoraka zrna kukuruza tijekom deset godina praćenja ovog patogena (Ćosić i sur., 2007). Osim već spomenutih gubitaka kvalitete zrna i smanjenih prinosa kukuruza, dolazi i do nakupljanja mikotoksina fumonizina u zrnu.

## **2.2. Mikotoksini**

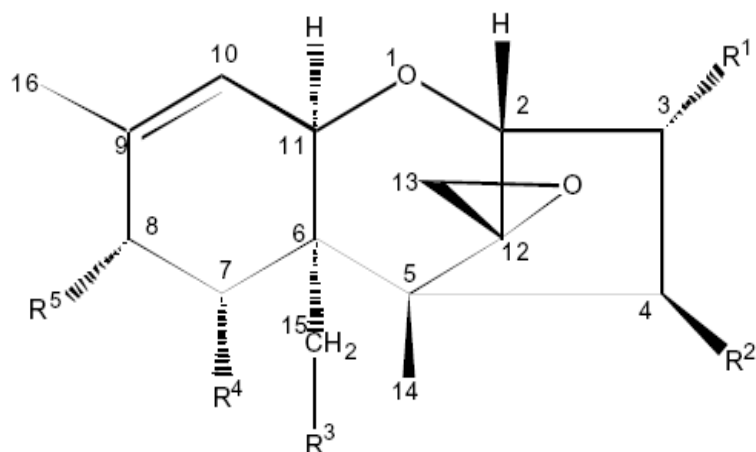
Gljive u svom razvojnem ciklusu produciraju primarne metabolite koji su im neophodni za rast i razvoj, a neke od njih mogu sintetizirati i sekundarne metabolite – mikotoksine. Biosinteza sekundarnih metabolita ovisna je o vrsti gljivica, o gljivičnom soju i njegovim genetskim osobinama (Kosalec i sur., 2004) a mogu je potaknuti i okolišni uvjeti, odnosno fizikalno-kemijski parametri poput količine slobodne vode ( $a_w$ ), temperature, količine kisika, sastava i pH supstrata, i dr. (Yiannikouris i sur., 2002). Do sada je izolirano

više od 300 različitih spojeva mikotoksina (Binder i sur., 2007). Mikotoksini su relativno stabilne molekule, uglavnom niske molekularne mase (Eskola, 2002). Nastanak mikotoksina može započeti predžetveno u inficiranoj biljci koja je još u polju i može biti nastavljena ili inicirana poslije žetve, a može nastati i u uskladištenim proizvodima (Logrieco i sur., 2003). Mikotoksini najčešće ingestijom, vrlo rijetko inhalacijom ili transdermalno, uzrokuju bolesti nazvane mikotoksikoze (Kosalec i sur., 2004). Simptomi mikotoksikoza ovise o nizu čimbenika: koncentraciji i dužini ekspozicije mikotoksinu, o vrsti i farmakodinamičkim osobinama mikotoksina (apsorpciji, hidrofilnosti/lipofilnosti, distribuciji u tkivima i organima, metabolizmu i poluvremenu raspada te eliminaciji), zatim o vrsti, spolu, starosti i zdravstvenom statusu životinje (Kosalec i sur., 2004). Uslijed akutne ili dugoročne izloženosti moguća su teratogena, kancerogena, estrogenska ili imunosupresivna djelovanja (Binder i sur., 2007). Toksični učinci se ne odnose samo na akutna trovanja ili akutne i kronične mikotoksikoze već i na ekonomičnost stočarske proizvodnje. Kod rasplodne stoke može doći do snižene stope začeća, pobačaja, smanjenog broja i vitalnosti mladunčadi te povećane smrtnosti, dok oslabljen imunitet dovodi do komplikacija zbog bakterijskih, gljivičnih i virusnih infekcija (Pepeljnjak i sur., 1999). Stoga je vrlo važno upoznati putove kontaminacije stočne hrane mikotoksinima i, što je još bitnije, spoznati načine učinkovite fungalne i mikotoksikogene prevencije.

Mikotoksini najbitniji za javno zdravlje, a koji su agroekonomski značajni, uključuju aflatoksine, ohratoksine, trihotecene, zearalenone, fumonizine, tremorgene toksine i ergot alkaloide koje sintetiziraju rodovi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Claviceps*, *Penicillium* (Hussein i sur., 2001). Iako rod *Fusarium* pripada parazitima polja, a ne saprofitima skladišta, evidentna je globalna kontaminacija zrna žitarica i stočne hrane *Fusarium* mikotoksinima, posebice trihotecenima, zearalenonom i fumonizinima (Placinta i sur., 1999). Kako su patogeni *F. graminearum* i *F. verticillioides* vrlo frekventni na području istočne Hrvatske, naglasak će biti na mikotoksinima koje produciraju i posljedičnim mikotoksikozama.

### **2.2.1. Trihoteceni tipa B**

Poznato je oko 180 trihotecena, ali samo njih nekoliko je značajno za ljudsko zdravlje (Murphy i sur., 2006). Trihoteceni su metaboliti seskviterpenoida koje produciraju mnogi rodovi gljiva uključujući *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotris*, *Trichoderma*, *Trichothecium* i drugi (Hussein i sur., 2001; Bennett i sur., 2003). Oni posjeduju tetraciklički 12,13 epoksitrihotecenski kostur (Slika 1; Tablica 1) (WHO, 1990).



Slika 1: Kemijska struktura trihotecena tipa A i B, supstituenti R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup> prikazani su u Tablici 1

Tablica 1: Kemijska struktura supstituenata R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup> u trihotecena tipa A i B (Eriksen, 2003)

Trihoteceni	R1	R2	R3	R4	R5
			Tip A		
HT-2 toksin	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
T-2 toksin	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Diacetoksiscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
			Tip B		
Deoksinivalenol	OH	H	OH	OH	O
3-acetil deoksinivalenol	OAc	H	OH	OH	O
15-acetil deoksinivalenol	OH	H	OAc	OH	O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	O
Fuzarenon-X	OH	OAc	OH	OH	O

Trihoteceni se klasificiraju kao makrociklički i nemakrociklički. Nemakrociklički trihoteceni su najčešći i dijele se na grupe: tip A, koji imaju vodik ili ester na C-8 poziciji (T2 toksin, neozolaniol, diacetoksiscirpenol) dok tip grupe B sadrži keton i uključuje deoksinivalenol (DON), 3-acetil deoksinivalenol (3-AcDON), 15-acetil deoksinivalenol (15-AcDON), nivalenol (NIV) i fuzarenon X (Bennett i sur., 2003). Sposobnost sinteze deoksinivalenola i njegovih acetiliranih derivata imaju *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* i *F. pseudograminearum* (Glenn, 2007). Treća kategorija (tip C) ima drugi epoksidni prsten na C-7,8 ili C-9,10 i toksini četvrte grupe (tip D) sadrže makrociklički prsten između C-4 i C-15 s dvije ester-veze (Eriksen, 2004a). Trihotecene tipa C i D ne producira rod *Fusarium* (Eriksen, 2004). Većina trihotecena je topiva u otapalima kao što su aceton, kloroform i etil-acetat, dok su visoko hidroksilirani trihoteceni DON i NIV topivi u polarnim otapalima kao što su acetonitril, metanol, etanol i voda (Eriksen, 2003). Trihoteceni su stabilni pri visokim



temperaturama, ne razgrađuju se normalnim procesiranjem hrane i ne hidroliziraju probavom nakon ingestije (Eriksen, 2003; Hazel i sur., 2004).

### **2.2.1.1. Toksičnost**

Trihoteceni su potentni citotoksini (Agag, 2005). Uobičajen učinak trihotecena na životinjsku i biljnu stanicu uključuje inhibiciju proteina i sintezu DNA i RNA, inhibiciju funkcije mitohondrija, dijeljenja stanice i djelovanje membrane. U životinjskoj stanici trihoteceni induciraju apoptozu mitohondrijskim i nemitohondrijskim mehanizmima (Rocha i sur., 2005). Ovisnost svih staničnih metaboličkih procesa o sintezi proteina sugerira da mnogi drugi učinci trihotecena mogu biti sekundarni inhibiciji sinteze proteina (Rocha i sur., 2005).

Iako manje toksičan od drugih trihotecena, deoksinivalenol je mikotoksin koji se najčešće pronalazi u zrnju žitarica, uključujući kukuruz, pšenicu, ječam, zob i druge žitarice, kao i u stočnoj hrani (Visconti, 2001; Bennett i sur., 2003; Morgavi i sur., 2007). Deoksinivalenol može imati štetne učinke na zdravlje nakon kratkoročne ili dugoročne izloženosti. Nakon akutne izloženosti deoksinivalenol izaziva dva karakteristična toksična učinka: smanjen unos hrane (anoreksija) i povraćanje (Creppy, 2002). Akutni simptomi trovanja uključuju gubitak težine, odbijanje hrane, povraćanje, krvavu dijareju i teške hemoragijske dermatitise (Eriksen, 2003). Povraćanje i anoreksija su posredovani serotonergičkim sustavom centralnog živčanog sistema ili perifernim djelovanjem na serotoninse receptore (Schlatter, 2004). DON inhibira sintezu DNA, RNA i proteina na ribosomskoj razini i ima hemolitični učinak na eritrocite (Schlatter, 2004). Leukociti su centralna meta deoksinivalenola i drugih trihotecena, a ovisno o dozi i učestalosti izloženosti, učinak DON-a može biti imunostimulatoran ili imunosupresivan (Pestka i sur., 2004). U životinja glavni učinak niske koncentracije DON-a u hrani ( $>2 \text{ mg g}^{-1}$  u krmi za svinje) čini se dovodi do smanjenog unosa hrane (anoreksija), a time i smanjenog porasta težine, dok veće doze ( $>20 \text{ mg g}^{-1}$ ) induciraju odbijanje hrane, dijareju i povraćanje (Visconti, 2001). Među životinjama, svinje su najosjetljivije na DON, dok su perad i preživači manje osjetljivi (Čonková i sur., 2003; Avantaggiato i sur., 2004). Preživači i perad toleriraju do 20 ppm DON-a u krmi, dok 1-2 ppm uzrokuje toksikoze u svinja (Pestka, 2007). Klinički znakovi intoksikacije DON-om u svinja uključuju i blagu bubrežnu nefrozu, reduciranu veličinu štitnjače, želučanu mukozalnu hiperplaziju, povećan omjer albumin/alfa globulin i ponekad blage promjene u drugim hematološkim parametrima (JECFA, 2001). Ishrana pilića s

pšenicom koja je prirodno kontaminirana *F. graminearumom* za posljedicu ima smanjeni unos krme, a time i manji prirast mesa pilića (Mannon i sur., 1988).

U Aziji su se pojavili mnogi slučajevi akutne humane izloženosti DON-u konzumiranjem zaraženog zrna, a simptomi uključuju mučninu, povraćanje, gastrointestinalne probleme, vrtoglavicu, dijareju i glavobolju (Hussein i sur., 2001; Creppy, 2002). Potencijalan izvor izloženosti ljudi DON-u mogla bi biti jaja, ali razine nisu signifikantne u usporedbi s drugim izvorima (Sypecka i sur., 2004).

Acetilirani derivati DON-a, 3-acetil deoksinivalenol i 15-acetil deoksinivalenol se ponekad pojavljuju u manjoj količini uz DON na zrnju žitarica. Imaju istu ili manju toksičnost od DON-a, i smatra se kako ne predstavljaju dodatni rizik (Pestka, 2007). Acetilirani derivati su prisutni u razini od 10-20% količine DON-a (Schlatter, 2004), a odnos između DON-a i acetiliranih formi varira. Acetilirani toksini se brzo deacetiliraju *in vivo* (fuzarenon-X u NIV, 3-acetilDON u DON) (Eriksen i sur., 2004a).

*Fusarium cerealis* i *F. poae* su glavni producenti nivalenola, a mogu ga sintetizirati i *F. culmorum* i *F. graminearum* (Eriksen, 2003). Nivalenol se obično pojavljuje u žitaricama uz DON, ali je pojavnost DON-a učestalija i u većim koncentracijama (Bottalico, 1998). Nivalenol se češće pojavljuje u Europi, Australiji i Aziji negoli u Americi, gdje je pojavnost nivalenola malog opsega (Eriksen, 2003). Toksikološki profil nivalenola je sličan deoksinivalenolu te nema naznaka da bi NIV mogao imati kancerogena svojstva (Schlatter, 2004).

Međunarodna agencija za istraživanje raka 1993. godine je svrstala deoksinivalenol u grupu 3, jer se zbog nedovoljno eksperimenata i podataka na pokusnim životinjama ne može klasificirati kao kancerogen za ljude. Maksimalna prihvatljiva razina kontaminacije DON-om u žitaricama i hrani na bazi kukuruza u Europi propisana je preporukom Europske komisije od lipnja 2005 (EC No 856/2005), a revidirana je u srpnju 2007 (EC No 1126/2007) (Boutigny i sur., 2008). Europska komisija je utvrdila i vrijednosti za deoksinivalenol u proizvodima namijenjenima za animalnu prehranu (Official Journal of the European Union, No 576/2006). Dozvoljene vrijednosti za žitarice i proizvode od žitarica (sa sadržajem od 12% vlage) su 8 ppm, a za kukuruz 12 ppm. Gotove krmne smjese smiju sadržavati do 5 ppm DON-a. Izuzetak su krmiva za svinje koja smiju sadržavati 0,9 ppm te krmiva za telad i janjad: 2 ppm. Hrvatsko zakonodavstvo određuje razine DON-a Pravilnikom o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje objavljenim u Narodnim novinama Republike Hrvatske br. 118/2007, koji propisuje najveće dopuštene količine u krmivima od žitarica i proizvoda od žitarica: 5 ppm, nusproizvodima kukuruza: 5 ppm, dopunskim i potpunim krmnim smjesama:

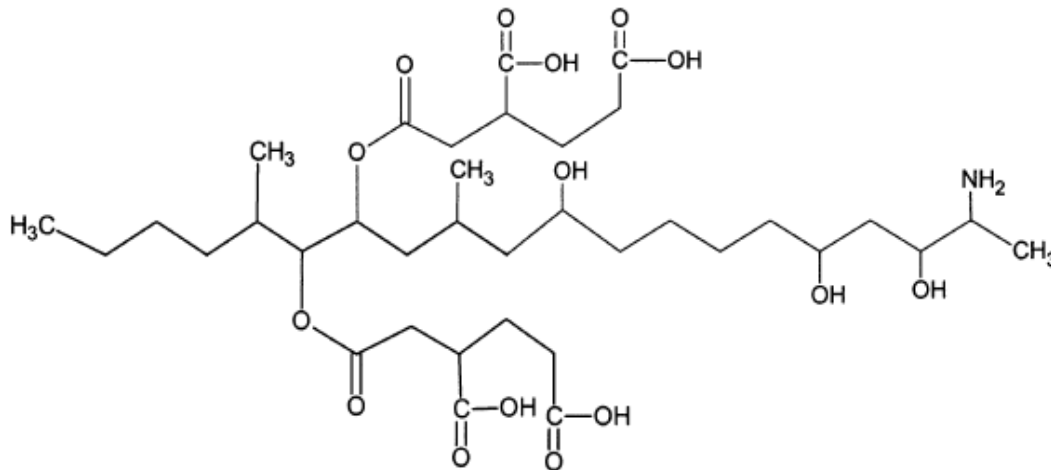
2 ppm. Dopuštena količina dopunskih i potpunih krmnih smjesa za svinje iznosi 0,5 ppm i dopunskih i potpunih krmnih smjesa za telad od 4 mjeseca, janjad i jarad: 1 ppm, uz udio vode u hrani za životinje od 12%.

### **2.2.2. Fumonizini (B)**

Fumonizini su vodotopivi mikotoksini koje producira nekoliko vrsta roda *Fusarium*, ali prvenstveno *Fusarium verticillioides* i *Fusarium proliferatum* (Krska i sur., 2007). Identificirane su četiri grupe fumonizina na temelju strukturalne sličnosti: A, B, C i P serija, unutar kojih je opisano 28 analoga fumonizina (Abbas i sur., 1998; Rheeder i sur., 2002; Krska i sur., 2007). Fumonizin B (FB) analozi, koje čine toksikološki bitni FB1, FB2 i FB3, su najrašireniji fumonizini u prirodi, dok FB1 dominira i obično se nalazi u najvišoj koncentraciji (Rheeder i sur., 2002). FB1 obično čini 70 do 80% ukupnih fumonizina, dok FB2 čini 15-25% i FB3 3-8% kada se uzgajaju na zrnju žitarica (Marin i sur., 1995; Marin i sur., 1995b; Abbas i sur., 1998; Krska i sur., 2007). Uz pretpostavku da je biosintetski put fumonizina sličan biosintezi drugih fungálnih sekundarnih metabolita (aflatoksini i trihoteceni), tada manje oksigenirani homolozi, kao što su FB4, FB3, FB2 predstavljaju biosintetske prekursora najjače oksigeniranog homologa FB1 (Desjardins i sur., 1996).

#### **2.2.1.1. Toksičnost**

Prema kemijskoj građi (Slika 2), FB1 je diester propan-1,2,3-trikarboksilne kiseline (Creppy, 2002). Fumonizini su građom slični sfingolipidnim prekursorima (sfinganinu ili drugim sfingoidnim bazama) i uzrokuju inhibiciju ključnog enzima ceramid sintetaze u biosintezi sfingolipida (Ciacci-Zanella i sur., 1999), pa njihova toksičnost može biti uzrokovana povećanjem intracelularne razine sfingolipidnih prekursora (sfinganina i sfingozina) i opadanjem sadržaja sfingolipida (Turner i sur., 1999).



Slika 2: Struktura FB1

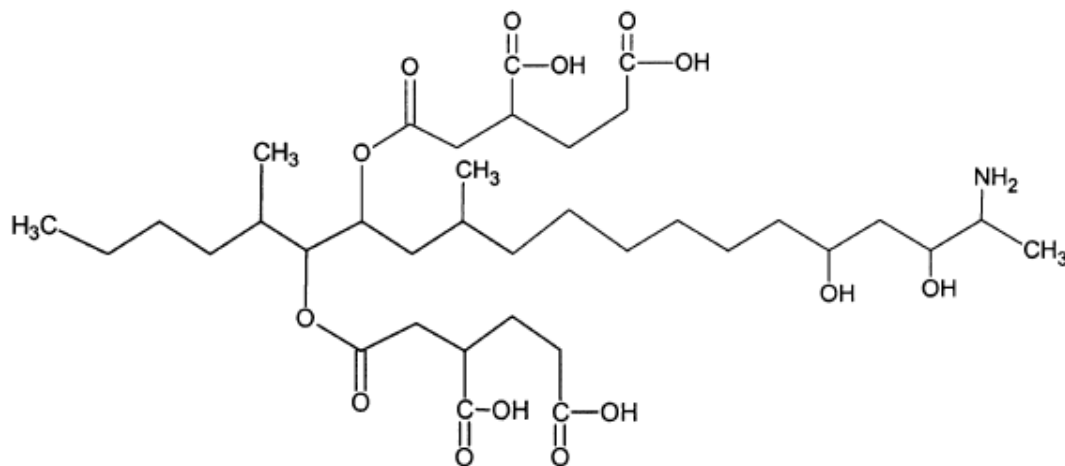
Sfingolipidi su vrsta membranskih lipida koji igraju bitnu ulogu u regulaciji stanice kontrolirajući određene funkcije membranskih proteina, pa tako fumonizinsko ometanje normalnog sfingolipidnog metabolizma utječe na veliki broj procesa (Turner i sur., 1999). Druga hipoteza toksičnosti fumonizina uključuje ometanje metabolizma masnih kiselina i glicerofosfolipida (Creppy, 2002). Izazivaju i druge promjene u stanici, poput oksidativnog stresa, koje su, najvjerojatnije, neovisne o učinku na metabolizam lipida.

FB1 je pronađen u biološki značajnoj razini u kukuruзу i raznim proizvodima od kukuruza namijenjenim za prehranu ljudi i životinja (Shephard i sur., 1996). Ingestija kukuruza kontaminiranog fumonizinima povezana je s pojavom leukoencefalomalacije u konja, neurološkim sindromom karakteriziranom s centralnom, često prostranom, likvefakcijskom nekrozom bijele tvari mozga i s akutnim plućnim edemom u svinja s brzim oticanjem pluća u prsnoj šupljini (Marasas, 1995). FB1 je hepatotoksičan i nefrotoksičan na svim ispitivanim pokusnim (štakori, miševi) i domaćim životinjama (konji, svinje, preživači, ovce, janjad, perad, ribe, zečevi, kune) uzrokujući apoptozu kojoj slijedi mitozu u oštećenom tkivu (Voss i sur., 2007). FB1 je u svinja i konja toksičan i za kardiovaskularni sustav (Voss i sur., 2007). Svinjski plućni edem se razvija kod koncentracija FB1 od preko 100 ppm, dok su oštećenja jetre vidljiva i u koncentracijama od 23 ppm (Čonková i sur., 2003). Također je utvrđeno kako u završnom tovu svinja već i 1 ppm FB1 toksina može imati negativan učinak na kakvoću mesa (povećan udio masti i smanjen postotak mesa) i uzrokovati ekonomske gubitke proizvođačima (Rotter i sur., 1996b). Perad je nešto otpornija na fumonizine, pa je

ustanovljena redukcija tjelesne težine kod purana hranjenih sa 75 mg FB1 po kilogramu hrane tijekom 18 tjedana (Čonková i sur., 2003).

Fumonizini su povezani s karcinomom jednjaka u ljudi koji su konzumirali kukuruz u Transkei području južne Afrike (Sydenham i sur., 1990), u sjevernoj Italiji, (Franceschi i sur., 1990) i Iranu (Shepard i sur., 2000). Nadalje, povezani su s promocijom primarnog raka jetre u određenim područjima Kine (Chu i sur., 1994; Ueno i sur., 1997). Otkrivena je i povezanost s oštećenjima neuralne cijevi u graničnom području Teksasa i Meksika (Missmer i sur., 2006) u populacijama koje konzumiraju relativno velike količine hrane na bazi kukuruza (Voss i sur., 2007). Postoji rizik izlaganja ljudi fumonizinima kroz rezidue u mesu, mlijeku i jajima (Turner i sur., 1999).

Kliničko-toksikološki odgovor FB2 (Slika 3), prema životinjskim studijama je sličan FB1 (Bondy i sur., 2000). Međutim, neka su istraživanja pokazala kako je FB2 citotoksičniji od FB1 u *in vitro* pokusu na staničnim linijama hepatoma štakora (Shier i sur., 1991) i primarnih hepatocita u štakora (Gelderblom i sur., 1993).



Slika 3: Struktura FB2

IARC je svrstao fumonizine u grupu 2B, tj. moguće kancerogene za ljude, temeljem dovoljnih dokaza o kancerogenosti na pokusnim životinjama. Europska komisija je utvrdila i dozvoljene vrijednosti za fumonizine (FB1+FB2) u proizvodima namijenjenima za animalnu prehranu (Official Journal of the European Union, No 576/2006). Maksimalna dozvoljena vrijednost za kukuruz i proizvode od kukuruza (od 12% vlage) je 60 ppm. Gotove krmne smjese za svinje, konje, zečeve i kućne ljubimce smiju sadržavati 5 ppm FB1+FB2, za ribe: 10 ppm FB1+FB2, za perad i janjad (mlađu od 4 mjeseca): 20 ppm FB1+FB2, dok smjese za

odrasle preživače starije od 4 mjeseca ne smiju sadržavati više od 50 ppm FB1+FB2. Hrvatsko zakonodavstvo određuje razine fumonizina FB1+FB2 Pravilnikom o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje objavljenim u Narodnim novinama Republike Hrvatske br. 118/2007, koji propisuje najveće dopuštene količine u krmivima od kukuruza i proizvoda od kukuruza, u dopunskim i potpunim krmnim smjesama za svinje, konje (*Equidae*), kuniće i kućne ljubimce: 5 ppm; ribe: 10 ppm; perad, telad (< 4 mjeseca), janjad i jarad: 20 ppm; goveda (> 4 mjeseca) i krznaše: 50 ppm kada je udio vode u hrani za životinje, preračunat na 12%.

### **2.2.3. Strategije prevencije nastanka i dekontaminacije mikotoksina**

Razvoj preventivnih strategija nastanka mikotoksina bazira se na HACCP pristupu tj. identificiranju ključnih kritičnih kontrolnih točaka prije i poslije žetve tj. berbe u lancu od polja do stola.

Predžetvena strategija prevencije nastanka mikotoksina u žitaricama obuhvaća sjetvu otpornijih sorti (hibrida) i izbjegavanje sjetve mekog zrna. Pravilno gospodarenje zemljištem što podrazumijeva poštivanje plodoreda. Zatim kultivacija tla uz preporuku oranja i unošenja žetvenih ostataka u tlo, jer se u reduciranoj i u gospodarenju bez obrade značajno povećava opasnost od kolonizacije usjeva plijesnima i mikotoksinima u usporedbi s oranjem. Navodnjavanje također ima bitnu ulogu u smanjenju stresa biljke u vrijeme njenog rasta. Bitna je i izbalansirana gnojidba jer dokazano je kako povećana gnojidba dušikom povećava rizik kontaminacije zrna rodnom *Fusarium*. Prevencija može uključivati korištenje bioloških i kemijskih agenasa jer je poznato da se pojavnost toksikogenih plijesni povećava s povećanjem oštećenja od insekata, ptica ili glodavaca (Kabak i sur., 2006; Magan i sur., 2007).

Žetvena strategija podrazumijeva odabir pravog vremena za žetvu koje se utvrđuje određivanjem vlažnosti zrna, izbjegavanje mehaničkog oštećenja zrna koje otvara put infekciji i izbjegavanje kontakata s tlom (Kabak i sur., 2006).

Posliježetvena strategija uključuje smanjenje vremena od žetve (berbe) do sušenja, zatim efikasno sušenje zrna na  $\leq 14\%$  vlage, učinkovitu higijenu skladišta, odsustvo štetočina u skladištu koji mogu osigurati vodu od vlastitog metabolizma i inicijalno zagrijavanje (Magan i sur., 2007), korištenje prikladnih konzervansa u prevenciji nastanka mikotoksina (Kabak i sur., 2006), i dr. Višegodišnjim ispitivanjima modificirane atmosfere ili alternativnih plinova za srednje i dugo skladištenje žitarica namijenjenih za hranu ili stočnu hranu,

utvrđeno je da je potrebno povećati razinu CO<sub>2</sub> na >75% kako se ne bi pojavile mikotoksikogene plijesni u djelomično osušenom zrnu (Magan i sur., 2007). Pokušava se ustanoviti i učinak fumigacije sa SO<sub>2</sub> u cilju kontrole fungalnog kvarenja u skladištu (Magan i sur., 2007; Pateraki i sur., 2007). Primjena fungicida i herbicida također se iskorištava u cilju prevencije rasta plijesni i biosinteze mikotoksina (Kabak i sur., 2006). Neka su istraživanja pokazala kako uporaba niskih doza fungicida može smanjiti porast *Fusariuma*, ali ujedno i stimulirati produkciju DON-a i do 20 puta više u usporedbi s kontrolom (Magan i sur., 2002). Iskorištavaju se i antimikrobna svojstva sorbinske i benzojeve kiseline u skladištima. Ispituje se i korištenje konzervansa na bazi propionata na akumulaciju FB1 u uskladištenom zrnu, ali se nisu pokazali efikasnim (Marin i sur., 2000). Kako su konzervansi na bazi alifatskih kiseline fungistatici (za razliku od mogućeg fungicidnog i fungilitičkog djelovanja) ispituje se učinkovitost alternativnih komponenti kao što su eterična ulja i antioksidansi u sprječavanju rasta i akumulacije mikotoksina u djelomično osušenom zrnu (Magan i sur., 2007). Osim toga, postoji i pritisak smanjenja uporabe kemijskih aditiva općenito u industriji hrane i okretanje alternativnim pristupima kao što su već spomenuti antioksidansi, eterična ulja biljaka, ali i uporaba proizvoda bakterija i gljiva (Aldred i sur., 2004).

U slučaju pojave mikotoksina u uskladištenom materijalu provodi se postupak dekontaminacije koja se može podijeliti na fizikalnu, kemijsku i biološku.

Fizikalna dekontaminacija obuhvaća sortiranje zrna tj. otklanjanje oštećenog zrna i sortiranje po gustoći, pranje zrna tekućom vodom ili otopinom natrijevog-karbonata, kao i termalne tretmane. Meljava zrna također spada u fizikalne metode, iako nema direktan učinak na smanjenje mikotoksina već na preraspodjelu u različite frakcije. Npr., meljava zrna s površinskom kontaminacijom rezultirat će s manje mikotoksina u brašnu, a više u klici i mekinjama (Jouany, 2007). Moguće je i korištenje adsorbenata (aktivnog ugljena, bentonita, celita, itd.) koji imaju kapacitet vezanja i imobilizacije mikotoksina u probavnom traktu. Ozračivanje gama zrakama, UV i X zrakama reducira kontaminaciju fungalnim sporama i degradira već proizvedene mikotoksine (Aziz i sur., 2002; Yiannikouris i sur., 2002; Soriano i sur., 2004; Kabak i sur., 2006; Jouany, 2007).

Kemijske metode obuhvaćaju korištenje kiselina (kloridna kiselina, limunska kiselina), baza (amonij-hidroksida, kalcij-hidroksida, natrij-hidroksida), oksidirajućih agenasa (vodik-peroksida), reducirajućih agenasa (natrij-bisulfita), klorirajućih agenasa (natrij-hipoklorita), itd. (Soriano i sur., 2004; Kabak i sur., 2006; Jouany, 2007). Ove metode se ne upotrebljavaju često zbog visoke cijene i rezidua koji zaostaju u hrani (Yiannikouris i sur., 2002).

Biološke metode obuhvaćaju korištenje bakterija kao npr. ruminalne i intestinalne flore koja omogućava otpornost preživača na intoksikacije mikotoksinima, i to *Eubacterium* vrste te rodovi *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium* koji smanjuju apsorpciju aflatoksina i ohratoksina iz probavnog trakta. Osim bakterija koriste se i kvasci i gljive: kvasac *Trichosporon* deaktivira zearalenon, *Exophiala spinifer* hidrolizira FB1, a gljive poput *Trichoderma* sp., *Phoma* sp. i *Rhizopus* sp. razgrađuju aflatoksin B1 (Bata i sur., 1999; Yiannikouris i sur., 2002; Soriano i sur., 2004; Jouany, 2007).

### **2.2.3.1. Mogućnosti nastanka mikotoksina u uskladištenom materijalu**

Iako se *Fusarium* često klasificira u plijesni polja zbog njihove potrebe za većom vlažnosti supstrata, postoji realna opasnost od kontaminacije uskladištenih žitarica ovim rodovima. Nakon žetve, zrnje žitarica, koje je oboljelo u poljskim uvjetima (i koje može ali i ne mora imati vidljive simptome zaraze) dospijeva u skladišta i silose te kontaminira uskladišteni materijal. Uz povoljne uvjete okolišne vlažnosti i temperature ono će nastaviti svoj rast i razvoj kao i produkciju mikotoksina. Ključni uvjeti skladištenja su temperatura, pristupačnost vode i sastav plinova koji utječu na stupanj fungalnog kvarenja i produkciju mikotoksina (Magan i sur., 2003). Mikotoksikogene plijesni koje se pojavljuju u djelomično osušenom zrnju čine *Penicillium verrucosum* (ohratoksin) u hladnijim predjelima sjeverne Europe i *Aspergillus flavus* (aflatoksini), *A. ochraceus* (ohratoksin) i neke *Fusarium* vrste (fumonizini, trihoteceni, zearalenoni) u umjerenim i tropskim žitaricama (Magan i sur., 2007; Kabak i sur., 2006). Berba kukuruza često se vrši pri sadržaju vlage od >14-15% što zahtijeva sušenje kako bi se smanjila pristupačna voda na  $a_w < 0,70$  (14%), što je sigurno za skladištenje. Često se ipak kukuruz ostavlja na čekanju tijekom kritičnog perioda ako su sušare u punom kapacitetu, što omogućava rast i kontaminaciju posebice rodovima *Fusarium* sekcijom *Liseola*: *F. verticillioides*, *F. proliferatum* (fumonizini), *F. graminearum* (trihoteceni, zearalenoni) i *Aspergillus flavus* (aflatoksini) (Magan i sur., 2007) te tako manipulativno-tehnološki postupci od žetve (berbe) do skladištenja pogoduju daljnjem širenju plijesni (Pepeljnjak i sur., 1999). Osim toga, mikotoksikogene plijesni se mogu pojaviti u skladištima kao rezultat izmjenjive vlažnosti u samom zrnju ili kao rezultat migracije vlage koja dolazi od zrna koje se hladi, a koje je smješteno blizu zidova skladišnih kontejnera/silosa što omogućava stvaranje mokrih točaka s povoljnim mikroklimatskim uvjetima za fungalni rast (Kabak i sur., 2006;



Magan i sur., 2007). Nedovoljno aerirana skladišta i neravnomjerna raspodjela vlage također stvaraju povoljne uvjete za razvoj plijesni. Nadalje, intenzivnim disanjem zrna povećava se relativna vlaga i povisuje se temperatura uskladištene mase što dovodi do samozagrijavanja zrna što stvara idealne uvjete za razvoj toksikogenih plijesni. Ne smije se zanemariti ni uloga skladišnih insektnih štetočina koji mogu biti uključeni u dominaciju mikotoksikogenih vrsta u skladištu pomažući im u raspršivanju, kao vektori i nosači toksina kroz uskladišteni materijal (Magan i sur., 2003). Općenito loša posliježetvena strategija može dovesti do brzog kvarenja nutritivne kvalitete zrna, dok mikrobnost aktivnost može uzrokovati nepoželjne učinke na zrnu uključujući promjenu boje, gubitke u suhoj tvari korištenjem ugljikohidrata kao izvora energije, razgradnju lipida i proteina, nastanak lako hlapljivih metabolita koji utječu na neugodan miris, gubitak germinacije, pekarske i sladne kvalitete što predstavlja značajnu opasnost u lancu prehrane (Magan i sur., 2007).

U Hrvatskoj je praćena prosječna desetogodišnja kontaminacija kukuruza uskladištenog u koševima i hambarima individualnih domaćinstava na području sjeverne i srednje Posavine od 1985-1995 g. (Pepeljnjak i sur., 1999). Udio uzoraka kontaminiranih plijesnima bio je kako slijedi: *Penicillium* (63,9%), *Rhizopus* (49,4%), *Fusarium* (47,7%) i *Absidia* (35,7%), dok su ostale vrste: *Aspergillus* (19,2%), *Trichoderma* (13,2%), *Botrytis* (12,6%) i druge „plijesni polja“ bile relativno slabo zastupljene. Mikološka kontaminacija žitarica u vezi je s klimatskim uvjetima pred sabiranje usjeva što se odražava na učestalost kontaminacije žitarica u dvadesetčetverogodišnjem praćenju (1974-1998. god.) i to: *Fusarium* sp. (15,9-24,9%), *Alternaria* sp. (7,9-9,5%), *Cladosporium* sp. (2,4-6,6%), *Absidia* sp. (9,3-12,8%), *Trichoderma* sp. (2,4-6,6%) (Pepeljnjak i sur., 1999). *Fusarium* vrste su podjednako učestale na kukuruzu i žitaricama kako u polju, koševima, hambarima individualnih proizvođača, tako i u silosima i uskladištenim krmnim smjesama (Pepeljnjak i sur., 1999).

Dvadesetogodišnjim pregledom nalaza mikotoksina u kukuruzu u razdoblju od 1975-1995. g. u domaćinstvima Hrvatske, učestalost mikotoksina je relativno visoka i u širokom rasponu koncentracija: ohratoksin A 0,0-68,9 ppm, zearalenon 0,1-275,8 ppm, T-2 0,001-20,52 ppm, HT-2 3,2-31,2 ppm, deoksinivalenol 0,02-85,3 ppm, diacetoksiscirpenol 25-25,6 ppm, nivalenol 0,08-4,04 ppm (Pepeljnjak i sur., 1999). Učestalost mikotoksina u uskladištenim žitaricama individualnih proizvođača od 1975-1988. na području sjeverne i srednje Hrvatske bila je: ohratoksin A 0,01-68 ppm, zearalenon 0,001-275,8 ppm, T-2 0,01-20,5 ppm, HT-2 3,2-31,2 ppm, deoksinivalenol 0,02-85,3 ppm, diacetoksiscirpenol 0,6-40 ppm, nivalenol 0,08-4 ppm, aflatoksin 0,005-0,05 ppm (Pepeljnjak i sur., 1999).

### **2.2.3.1.1. Optimalni abiotski uvjeti rasta *Fusarium* sp.**

Okolišni uvjeti igraju bitnu ulogu u rastu plijesni i proizvodnji mikotoksina. Ključan je utjecaj abiotskih uvjeta kao što su temperatura i aktivitet vode ( $a_w$ ) na vegetativan rast i proizvodnju *Fusarium* mikotoksina. Aktivitet vode se definira kao odnos parcijalnog tlaka vodene pare na površini proizvoda i parcijalnog tlaka vodene pare iznad čiste vode pri istoj temperaturi i predstavlja onaj sadržaja vlage koji može biti izmijenjen između proizvoda i njegovog okruženja. Sadržaj vlage predstavlja ukupnu vodu u proizvodu uključujući i molekularno vezanu vodu, ali slobodna „aktivna“ voda je pristupačna mikroorganizmima za rast i označava se kao aktivitet vode ( $a_w$ ). Aktivitet vode ima veći učinak na fungalni rast nego temperatura (Samapundo i sur., 2005). *Fusarium* sp. mogu rasti pri različitim vrijednostima pristupačne vode, od 0,90-0,995 i temperature 20-35°C (Marin i sur., 1996). Optimalni uvjeti temperature se kreću oko 25°C, uz pristupačnost vode oko  $a_w$  0,98 što su potvrdala znanstvena istraživanja (Velluti i sur., 2000a). Prema istraživanju Ramirez i sur. (2006), optimalni uvjeti za rast *Fusarium graminearum* na ozračenom zrnu pšenice su 25°C i  $a_w$  0,995 dok je razina DON-a bila najveća pri  $a_w$  0,995 i 30°C. Pokazalo se kako *F. verticillioides* ne germinira pri  $a_w$  0,92 i 20°C na zrnu kukuruza, dok je maksimalan porast zamijećen pri  $a_w$  0,98 i 30°C (Torres MR i sur., 2003). Maksimalna produkcija FB1 i FB2 odvija se pri  $a_w$  0,956 i 0,968 na 25°C i 30°C (Marin i sur., 1995).

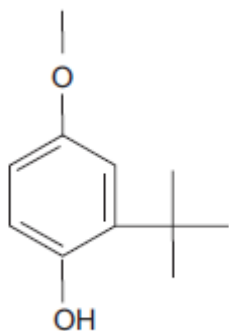
Abiotski uvjeti imaju bitnu ulogu u fungalnoj kolonizaciji u periodu prije i poslije žetve. Između svilanja i žetve zrno kukuruza sadrži oko 40-50% vode ( $a_w=1$ ), a sazrijevanjem zrna taj sadržaj se smanjuje na 20-25% ( $a_w=0,90-0,95$ ). Tijekom perioda sazrijevanja i nalijevanja zrna sadržaj vode favorizira kolonizaciju s *Fusarium* sp. (Marin i sur., 1998a) kako u kukuruzu tako i u svim žitaricama malog zrna. Osim abiotskih uvjeta koji su optimalni za rast *Fusarium* sp., ne smije se zanemariti ni biotska interakcija u uskladištenom zrnu uslijed različitih okolišnih parametara (Marin i sur., 1998b).

### **2.2.3.2. Antioksidansi**

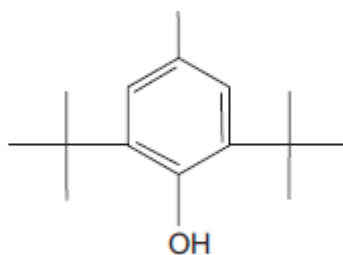
Antioksidansi imaju sposobnost usporavanja ili sprječavanja oksidacije drugih molekula te se dodaju hrani i stočnoj hrani kako bi se spriječilo njeno kvarenje. Dodaci stočne hrane u obliku antioksidanasa nisu korisni samo u zaštiti samih životinja već također potpomažu i očuvanju nutritivnih vrijednosti i okusa njihovih proizvoda (Salobir i sur., 2007).

### 2.2.3.2.1. Sintetski antioksidansi i mehanizam djelovanja

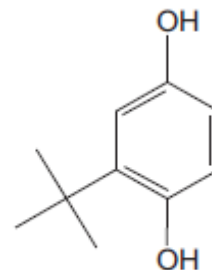
Sintetski antioksidansi kao što su butilirani hidroksianisol, butilirani hidroksitoluen i tert-butilhidrokinon su u širokoj upotrebi kao antioksidansi hrane (Balasundram i sur., 2006) i stočne hrane u cilju zaštite nezasićenih lipida i drugih tvari od kvarenja oksidativnom degradacijom (Giridhar i sur., 2001).



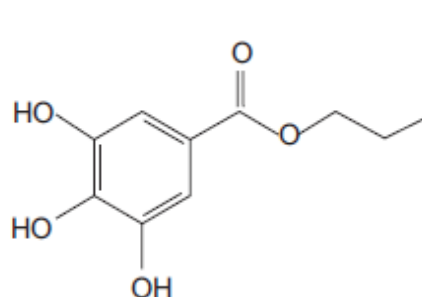
butilirani hidroksianisol



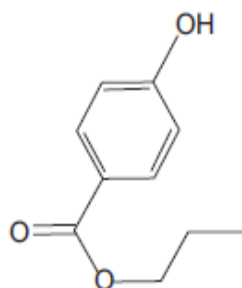
butilirani hidroksitoluen



tert-butilhidrokinon



propil galat



propil paraben

Slika 4: Strukturne formule fenolnih sintetskih antioksidanasa

Osim antioksidativnih osobina intenzivno se proučava i fungitoksičan učinak fenolnih antioksidanata i to već spomenutih BHA, BHT, TBHQ kao i propil galata, trihidroksibutirfenona, propil parabena (Slika 4), i dr. na micelijski rast *Aspergillus* i *Penicillium* i proizvodnju aflatoksina na umjetnim podlogama, ali i u namirnicama (Ahmand i sur., 1981; Lin i sur., 1983; Nesci i sur., 2003). Ispitivanja minimalne inhibitorne koncentracije fenolnih sintetskih antioksidanasa BHA, BHT, PG, PP, TBHQ i THBP na mikotoksikogene *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* vrste na tekućim i krutim podlogama

ispitao je i Thompson (1992). U ovoj studiji najučinkovitijim su se pokazali BHA i PP u koncentraciji od 250 ppm za *F. graminearum* na obje vrste podloga, tj. BHA u koncentraciji od 250 ppm za *F. verticillioides* i 500 ppm PP i TBHQ na krutoj podlozi i po 500 ppm BHA, PP i TBHQ za isti soj u bujonu. Ispitivanja Thompsona i sur. (1993) su uzela u obzir i učinak pH na fungitoksičnu aktivnost fenolnih antioksidanasa. Utvrđena je veća učinkovitost PP u odnosu na BHA u inhibiciji konidijalne germinacije ispitivanih *Penicillium* i *Fusarium* vrsta.

Ispitana je i minimalna inhibitorna koncentracija estera p-hidroksibenzojeve kiseline (butil parabena, etil parabena, metil parabena i propil parabena) protiv toksikogenih gljiva rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Thompson, 1994). Autor je zaključio kako su najučinkovitiji inhibitori micelijskog rasta ispitivanih plijesni parabeni s najdužim lancem estera: propil i butil paraben, a najmanje učinkovit je metil paraben s najkraćim lancem estera.

Fenolni antioksidansi BHA, BHT i PG su ispitivani u kontroli toksikogenih vrsta *Aspergillus*, *Penicillium* i *Stachybotrysa* na umjetnim podlogama, gdje se BHA pokazao visoko učinkovitim u usporedbi s BHT i PG u inhibiciji vegetativnog rasta sedam od osam ispitivanih sojeva (Giridhar i sur., 2001). U ovoj studiji je utvrđena inhibicija sekalonične kiseline i satrotoksina *Penicillium purpurogenum* i *Stachybotrys atra* pri 100 ppm BHA. Proizvodnja aflatoksina B1, patulina, ohratoksina i penitrema B kompletno je inhibirana s 250 ppm BHA. BHT je kompletno inhibirao rast *S. atra* pri 250 ppm dok je bilo potrebno čak 1000 ppm BHT za inhibiciju *A. flavusa*, *P. citrinum* i *P. purpurogenum*. S druge strane, propil galat se pokazao kao blagi inhibitor rasta plijesni i proizvodnje toksina (Giridhar i sur., 2001).

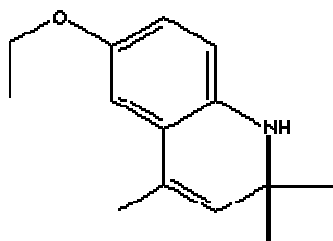
Istraživanja Reynoso i sur. (2002) pokazala su da niže koncentracije (0,5 i 1 mM) dva antioksidansa (PP-BHA, PP-BHT, PP-THBP) mogu biti učinkovitije zajedno nego pojedinačno. Pokazalo se kako PP-BHA ima dobar potencijal kontrole rasta *F. verticillioides* i *F. proliferatuma* kod aw 0,995 i 0,98 na umjetnim podlogama s kukuruzom. Također, pojedini tretmani (1 mM PP-BHT i PP-THBP pri aw 0,995) su pokazali stimulaciju proizvodnje fumonizina što bi značilo da kao odgovor na vodeni stres i antioksidanse, *Fusariumi* kao mehanizam opstanka produciraju više mikotoksina.

Antioksidansi butilirani hidroksianisol i propil paraben su se pokazali učinkoviti protiv rasta roda *Fusarium* sekcije *Liseola* (Etcheverry i sur., 2002; Aldred i sur., 2008.). Etcheverry i sur. (2002) su ispitali učinak BHA, PP, BHT i THBP na rast *F. verticillioides* i *F. proliferatuma* i proizvodnju fumonizina pri različitim temperaturama i aw, te su dokazali da BHA i PP u koncentracijama  $\geq 10$  mM inhibiraju rast i produkciju fumonizina pri aw 0,995 i 0,95.

Učinak dva najbolja antioksidansa u hrani, BHA i PP, na micelijski rast dvije vrste roda *Fusarium* i akumulaciju fumonizina, uz tri razine aktiviteta vode, na sterilnom zrnu kukuruza, ispitali su Torres AM i sur. (2003). U ovoj studiji su bile potrebne puno veće koncentracije ispitivanih tvari u inhibiciji rasta nego u istraživanjima Etcheverryja i sur. (2002) i to 500 ppm BHA i 500 ppm PP koje su dovele do redukcije micelijskog porasta *Fusariuma*, posebice na aw 0,95. Nadalje, 100 i 200 ppm na aw 0,995 i 0,95 je bilo neučinkovito za obje vrste roda *Fusarium*. Također je dokazano da oba antioksidansa značajno reduciraju razinu fumonizina, posebice pri aw 0,98 i 0,95, pa 500 ppm BHA pri aw 0,98 rezultira najmanjom razinom fumonizina, dok je pri aw 0,995 kada je voda pristupačna, redukcija fumonizina bila samo 20-30% (Torres AM i sur., 2003).

Farnochi i sur. (2005) su ispitali učinak BHA i PP na rast *F. verticillioidesa* i *F. proliferatum* i proizvodnju fumonizina, ali na prirodnom zrnu kukuruza na kojem je prisutna i kompetitivna mikoflora i to na dvije razine aktiviteta vode: 0,98 i 0,95. BHA (500 ppm i aw 0,95) reducira razinu fumonizina oko 82% u 7-om i 14-om danu, ali na kraju pokusa (28 dan) redukcija iznosi samo 32%. Veća kontrola produkcije fumonizina pokazala se s 1000 ppm BHA. PP pri aw 0,95 i koncentracijama od 500 ppm i 1000 ppm reducira razinu fumonizina od 56-76%. Uz aw 0,98 i BHA i PP kontroliraju proizvodnju fumonizina, ali samo nakon 7 i 14 dana, dok nakon 21 i 28 dana nema značajne razlike u količini fumonizina u usporedbi s kontrolom (Farnochi i sur., 2005). Autori su zaključili kako redukcija razine fumonizina može nastati zbog učinka antioksidanasa i zbog kompetitivne mikoflore posebice *Aspergillus* i *Penicillium* rodova.

Antioksidans etoksikvin (Slika 5) je također prepoznat kao jaki antiaflatoksikogeni agens (Hussein i sur., 2001) koji je široko raširen aditiv u stočnoj hrani gdje štiti autooksidacijske tvari bogate nezasićenim ugljikovodicima kao što su lipidi, karoteni, vitamini A i E (Berdikova Bohne i sur., 2007).



Slika 5: Strukturna formula etoksikvina

Mehanizam djelovanja antioksidanasa koji inhibiraju micelijski rast toksikogenih gljiva nije jasan (Aldred i sur., 2008). Thompson (1996) je utvrdio oštećenja stanične

micelijske membrane što dovodi do pojačanog istjecanja šećera, aminokiselina i proteina iz fungalne stanice *Fusarium* sp. tretirane s BHA. Smatra se da BHA i PP remete transport protona preko mitohondrijske i stanične membrane te time i proizvodnju energije i transport supstrata (Etcheverry i sur., 2002; Aldred i sur., 2008). Simonetti i sur. (2003) pretpostavili su kako je BHA membranski disruptor koji dovodi do promjena u permeabilnosti stanice, a samim tim do pojačanog istjecanja celularnih enzima.

Osim oštećenja stanične membrane fenolnim spojevima, visoke koncentracije antioksidanasa mogu dovesti do oksidativnog stresa stanice, nastanka slobodnih radikala što može dovesti do morfoloških promjena i fragmentacije DNA (Thompson i Moldéus, 1987; Kahl i sur., 1989; Iverson, 1999; Stamatii i sur., 1999; Atsumi i sur. 2005; Slamenova i sur. 2009).

Korištenje sintetskih antioksidanata je u nekim zemljama zabranjeno zbog nepoželjnih efekata na ljudsko zdravlje (Miguel i sur., 2005) te je potrebno smanjiti koncentracije ovih antioksidanasa u stočnoj hrani ili ih kombinirati s prirodnim antioksidansima i tvarima.

Prema Pravilniku o kakvoći stočne hrane (Narodne novine Republike Hrvatske br. 26/1998), da bi se spriječila oksidacija sirove masti i drugih nestalnih sastojaka, krmnim se smjesama mogu dodavati slijedeći antioksidansi: E320 (butilirani hidroksianisol) najviše 150 ppm pojedinačno ili u smjesi, E321 (butilirani hidroksitoluen), E324 (etoksikvin) te E310 (propil galat), najviše 100 ppm pojedinačno ili u smjesi.

#### **2.2.3.2.2. Prirodni antioksidansi i mehanizam djelovanja**

Eterična ulja su aromatske uljaste hlapive tekućine, sekundarni metaboliti, dobiveni iz biljnog materijala: cvijeća, pupa, sjemena, lišća, grana, kore, stabljike, drveta, plodova i korijena (Burt, 2004). Antimikrobna svojstva eteričnih ulja su prepoznata još od 50-ih godina prošloga stoljeća. Osim antibakterijskih osobina (Paster i sur., 1990; Hammer i sur., 1999; Elgayyar i sur., 2001; Mourey i sur., 2002; Al-Bayati, 2008), eterična ulja ili njihove frakcije posjeduju i antiviralna (Duschatzky i sur., 2005), antifungalna (Moleyar i sur., 1986; Akgül i sur., 1988; Arras i sur., 2001; Elgayyar i sur., 2001; Daferera i sur., 2003), antitoksikogena (Juglal i sur., 2002; Marin i sur., 2002; Selvi i sur., 2003; Velluti i sur., 2003), antiparazitna (Pandey i sur., 2000) i insekticidna svojstva (Konstantopoulou i sur., 1992). Eterična ulja kao antimikrobne agense označavaju dvije glavne karakteristike: prva je njihovo prirodno podrijetlo što bi moglo podrazumijevati veću sigurnost za ljude i okoliš. Također, smatra se da je riječ o tvarima s malom mogućnošću razvoja otpornosti od strane patogenih

mikroorganizama (Daferera i sur., 2003). Naime, vjeruje se da je patogenima teško razviti otpornost mješavini uljnih komponenti s različitim mehanizmima antimikrobne aktivnosti (Daferera i sur., 2003). Antifungalna i antimikotoksikogena svojstva pojedinih sastojaka eteričnih ulja prikazana su u Tablici 2.

Tablica 2: Glavne komponente odabranih eteričnih ulja koja pokazuju antimikrobna svojstva (Marin i sur., 2003; Burt, 2004)

Uobičajen naziv eteričnog ulja	Latinski naziv biljke	Glavne frakcije ulja	Približan sastav (%) <sup>a</sup>
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i> (mladi listovi)	Linalol	26
		E-2-decenal	20
Korijander	<i>Coriandrum sativum</i> (sjeme)	Linalol	70
		E-2-decenal	-
Cimet	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans cimetni aldehid	65
Cimet (Marin i sur., 2003)		Eugenol	82
		Kariofilen	5
		Eugenil-acetat	2
		Linalol	2
		Cimetni aldehid	1
		2-propenil benzodioksol	1
		Cimetni alkoholni acetat	1
		á-cubeben	< 1
Origano	<i>Origanum vulgare</i>	Karvakrol	U tragovima-80
		Timol	U tragovima-64
		γ- terpinen	2-52
		p-cimen	U tragovima-52
Klinčić (pupoljak)	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75-85
		Eugenil-acetat	8-15
Majčina dušica	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	10-64
		Karvakrol	2-11
		γ- terpinen	2-31
		p-cimen	10-56
Limunska trava		Geranial	52
		Neral	28
		Limonen	5
		Geranil-acetat	4
		Geraniol	2
		Metil-heptanon	1
		Palmarosa	
		3-karen	2
		Geranil-acetat	1

<sup>a</sup> postotak ukupnih hlapljivih tvari zaokružen na prvi cijeli broj

Moleyar i sur. (1986) su ispitivali antifungalnu učinkovitost nekih komponenta eteričnih ulja u pokusu *in vitro* u bujonu i na agaru. U tekućoj kulturi u inhibiciji *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* i *Penicillium digitatum* najboljim su se pokazali nezasićeni aldehidi (citrinal, cimetni aldehyd i citronelal), zatim geraniol i nezasićeni alkoholi, pri minimalnoj inhibitornoj koncentraciji od 100 ppm. Drukčiji rezultati dobiveni su u pokusu na krutoj podlozi kada su gore navedene komponente bile neuspješne u inhibiciji istih plijesni, ali su bile aktivne u inhibiciji *Rhizopus stolonifera* i *Mucor* sp.

Turski istraživači Akgül i sur. (1988) ispitivali su učinak deset turskih začina (sjeme crnog kumina, plod korijandra, plod kumina, plod kopra, list lovora, list origana, list peršina, list metvice, list slatkog bosiljka, sjeme bijele gorušice), eteričnog ulja origana, timola i karvakrola u sprječavanju rasta plijesni zagađivača hrane: rodova *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* i *Geotrichum*. Rezultati su pokazali kako niti jedan od začina osim origana nema inhibitorni učinak na fungalni rast, dok su eterična ulja origana (timol i karvakrol) i to u koncentraciji od 0,025% (w/v) i 0,05 % (w/v) pokazali kompletnu inhibiciju rasta testiranih plijesni. Slične rezultate su dobili i Paster i sur. (1990) koji su uspjeli s eteričnim uljem origana i timijana inhibirati rast *Aspergillus* pri 400, 600 i 700 ppm. Elgayyar i sur. (2001), ispitujući antimikrobnu aktivnost eteričnih ulja na patogene bakterije i saprofitne plijesni, zaključuju da je eterično ulje origana, najučinkovitije i kompletno inhibira rast ispitivanih *fungi imperfecti* (*Aspergillus niger*, *Geotrichum* i *Rhodotorul*). Juglal i sur. (2002) su ispitivali učinak začinskih ulja na proizvodnju mikotoksina. Ulje klinčića (eugenol) je bilo najinhibitornije na fungalni rast *Aspergillus parasiticus* i *Fusarium verticillioides*, a slijede ga cimet (cimetni aldehyd), origano (timol i karvakrol) i ulje muškato oraščića (miristin), dok ulja nima (*Azadirachta indica*) i eukaliptusa (cineol) nisu pokazala učinak na fungalni rast. Ulje klinčića suprimira proizvodnju AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 pri 0,5 ppm, dok 2 ppm ovog ulja reducira FB1 za 78% (Juglal i sur., 2002). Ista skupina autora je također zaključila kako antifungalna aktivnost ispitivanih aromatskih organskih tvari može biti vezana uz njihove aktivne komponente. Naime, sve ispitivane komponente imaju cikličku strukturu s postranim lancima osim eukaliptusa i nima koji su se pokazali antifungalno neučinkovitim. Poznato je da hidroksilna grupa može stvarati vodikove veze s aktivnim enzimima što rezultira deaktivacijom i utječe na učinak biosinteze toksina (Velluti i sur., 2004a).

Marin i sur. (2003) ispitivali su kontrolu fumonizina B1 u prirodno kontaminiranom zrnju kukuruza s *F. verticillioides* i *F. proliferatum* uz eterična ulja cimeta (82,3% eugenola), klinčića (88,2% eugenola), limunske trave (52% geranola, 28% nerala), origana



(70% karvakrola, 16,7% p-cimen) i palmarose (87,6% geraniola), pri dva aktiviteta vode (0,995 i 0,950) i dvije temperature (20 i 30°C), u koncentraciji od 500 ppm. Najbolji učinak su pokazali cimet, limunska trava i palmarosa na većem aktivitetu pri 20 i 30°C za *F. verticillioides*. *F. proliferatum* reducira sintezu FB1 uporabom cimeta, limunske trave i palmarose pri 20°C, ali redukcija nije statistički značajna. Autori su zaključili kako kompetitivna mikoflora igra bitnu ulogu u nastanku FB1, a djelotvornost eteričnih ulja u supstratu kao što su žitarice je manja u usporedbi sa sintetičkim medijima.

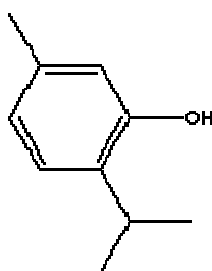
Velluti i sur. (2003) su ispitivali inhibitorni učinak eteričnih ulja cimeta, klinčića, limunske trave, origana i palmarose na rast *F. proliferatuma* i proizvodnju FB1 na ozračenom zrnu kukuruza. Zaključili su kako aw, temperatura i koncentracija eteričnih ulja ima značajan učinak na rast *F. proliferatuma*. Istraživači nisu ustanovili značajne razlike između učinka cimeta, origana, palmarose i limunske trave na tri različita izolata iste vrste. Različiti izolati su imali drugačiji odgovor na aw, temperaturu i koncentraciju eteričnih ulja. Svih pet ispitivanih eteričnih ulja je pokazalo inhibitorni učinak na rast *F. proliferatuma* na 20 i 30°C i pri aw 0,995, dok su na aw 0,950 samo cimet, klinčić i origano bili učinkoviti u inhibiciji rasta *F. proliferatuma* na 20°C i nijedan od njih na 30°C. Na smanjenu produkciju FB1 imali su učinak cimet, origano i palmarosa pri aw 0,995 i obje temperature, dok su klinčić i limunska trava imali dobar učinak na 30°C. Korištene su dvije koncentracije od 500 i 1000 ppm eteričnog ulja, ali pokazalo se da nema značajne razlike u njihovoj djelotvornosti. Autori su zaključili kako cimet i origano mogu biti učinkoviti u kontroli rasta i produkciji FB1 na kukuruza u predžetvenim uvjetima.

Velluti i sur. (2004a) su u istraživanja obuhvatili i *F. verticillioides* i ispitivali su učinak eteričnih ulja cimeta, klinčića, limunske trave, origana i palmarose na rast i FB1 produkciju pri dva aktiviteta vode (0,995 i 0,95), dvije temperature (20 i 30°C) i dvije koncentracije od 500 i 1000 ppm na ozračenom zrna kukuruza. Sva ispitivana eterična ulja su pokazala inhibitorni učinak koji je ovisio o aw, a učinak im je bio bolji pri nižem aw i nižoj temperaturi. Origano i limunska trava su bili najučinkovitiji u inhibiciji rasta *F. verticillioidesa* pri aw 0,995, dok su pri aw 0,95 origano i klinčić bili učinkoviti samo pri većoj koncentraciji eteričnog ulja. FB1 produkcija je bila inhibirana samo pri 30°C i aw 0,995 i to od strane svih ispitivanih eteričnih ulja podjednako u koncentraciji od 1000 ppm. U ovom istraživanju autori su primijetili i pojačanu produkciju toksina pri određenim okolišnim uvjetima: pri 20°C, aw 0,95 i aw 0,995 kod tretiranja kukuruza s eteričnim ulja origana te kod tretiranja kukuruza cimetom, klinčićem, palmarosom na 30°C i aw 0,95.

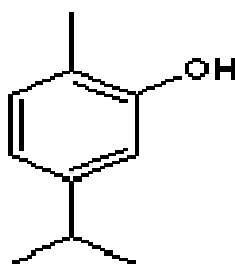
Slične rezultate dobili su i Lopez i sur. (2004) koji su ispitivali antifungalni i antimikotoksikogeni učinak četiri lokalne aromatske biljke: *Origanum vulgare*, *Aloysia triphylla*, *Aloysia polystachya* i *Mentha piperita* na rast *Fusarium verticilliodesa* i proizvodnju FB1 na zrnu kukuruza. *Origanum vulgare* (origano) pokazao se najučinkovitijim u inhibiciji micelijskog rasta kao i u inhibiciji sinteze FB1. Ova aromatična biljka ima visok sadržaj alkoholnih i fenolnih sastojaka (terpineol i timol 42,3% od ukupnog sadržaja ulja), a smatra se da eterična ulja sa sastojcima koji su oksigenirani imaju veću antifungalnu aktivnost u usporedbi s ugljikovodičnima (Lopez i sur., 2004).

Učinak eteričnih ulja cimeta, klinčića, origana, palmarose i limunske trave na rast *F. graminearum* i proizvodnju ZEA i DON-a pri dva aktiviteta vode (0,995 i 0,95), dvije temperature (20 i 30°C) i koncentraciji od 500 ppm na nesteriliziranom zrnu kukuruza ispitali su Marin i sur. (2004). Pri nižoj temperaturi nije utvrđena značajna inhibicija sinteze DON-a. Viša temperatura i aw 0,95 uz eterična ulja cimeta, klinčića i limunske trave inhibiraju akumulaciju DON-a, dok je origano i palmarosa stimuliraju. Potpuna inhibicija DON-a je utvrđena pri 30°C i aw 0,995. Općenito, učinak eteričnih ulja bio je slab što se može pripisati utjecaju kompetitivne mikoflore. Najboljim se pokazalo eterično ulje klinčića u simultanoj inhibiciji ZEA i DON-a (Marin i sur., 2004).

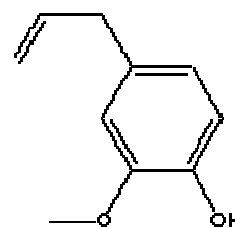
Eterična ulja klinčića, origana i cimeta sadrže aromatske komponente poput eugenola koji je glavna komponenta ulja klinčića i cimeta, i karvakrola koji je glavni sastojak ulja origana. Antimikrobna aktivnost ovih ulja najvjerojatnije se temelji na prisutnosti aromatske jezgre i fenolne OH grupe, koja je reaktivna i formira vodikove veze na aktivnim mjestima enzima (Velluti i sur., 2004a). Glavna komponenta palmarosa ulja je geraniol (alifatski alkohol), a limunske trave geranial i neral (alifatski aldehidi) koji također posjeduju antifungalna svojstva (Velluti i sur., 2004a) i određene antioksidativne osobine (Ruberto i sur., 2000).



timol



karvakrol



eugenol

### Slika 6: Struktura sastojaka eteričnih ulja

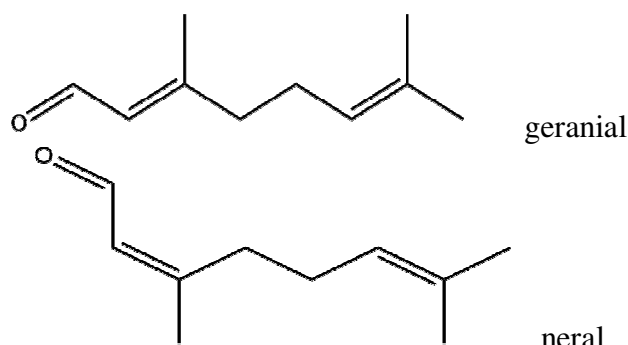
Općenito, fenoli posjeduju najveću antioksidativnu aktivnost (Ruberto i sur., 2000), pri čemu se potencijal antifungalne aktivnosti kreće kako slijedi: fenoli > alkoholi > aldehidi > ketoni > esteri > ugljikovodici (Kurita i sur., 1983). Antifungalnu aktivnost pokazuju eterična ulja koja sadrže fenolnu komponentu (Slika 6), a to su oksigenirani monoterpeni (timol, karvakrol, citral) te fenolni benzenski derivati (eugenol), dok alilni alkoholi posjeduju nešto slabiju antioksidativnu aktivnost (nerol, geraniol) (Ruberto i sur., 2000). Prisutnost pristupačnog vodikovog atoma fenola i/ili alilne skupine predstavlja dobru barijeru protiv oksidativnih procesa (Ruberto i sur., 2000).

Inhibitorni učinak aromatičnih tvari najčešće je povezana s hidrofobnošću, koja je direktno korelirana s  $\log^P$  (particijski koeficijent tj. raspodjela lipofilne komponente između oktanol i vode) i njihovom raspodjelom u citoplazmatsku membranu (Lanciotti i sur., 2003). Najhidrofobnije komponente su općenito najtoksičnije i stanična membrana je često glavno mjesto toksične djelatnosti (Sikkema i sur., 1995). Umetanje lipofilnih spojeva u membranu inducira promjene u njenim fizikalno-kemijskim osobinama, narušava integritet membrane i povećava pasivni protok protona kroz membranu (Ben Arfa i sur., 2005). Ovaj učinak je posebice dokazan s tvarima koje imaju  $\log^P$  veći od 3 (karvakrol 3,52; timol 3,30; eugenol 2,73) (Ben Arfa i sur., 2005; Nostro i sur., 2007). Utvrđen je i fungicidan učinak timola i karvakrola na fungalnu stanicu stvaranjem lezija na citoplazmatskoj membrani (Pina-Vaz i sur., 2004; Pinto i sur., 2006). Transmisijskom elektronskom mikroskopijom utvrđeno je kako niže koncentracije timola ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) uzrokuju dezorganizaciju staničnih organela fungalnih konidija i hifa, dok veće koncentracije ( $8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) dovode do gubitka stanične strukture i organizacije (Svircev i sur., 2007). Karvakrol, zahvaljujući svojoj hidrofobnosti, se može akumulirati u staničnoj membrani. Njegova sposobnost stvaranja vodikovih veza kao i sposobnost otpuštanja protona može inducirati konformacijske modifikacije membrane što dovodi do stanične smrti (Ben Arfa i sur., 2005).

Eugenol dovodi do oštećenja stanične stijenke i opsežne lize stanica (Thoroski i sur., 1989). Učinak eugenola na fungalnu stanicu je inhibicija germinacije konidija, oštećenje konidijalnih membrana, inhibicija formiranja apsorija i otjecanje citoplazmatskog sadržaja (Herath i sur., 2008).

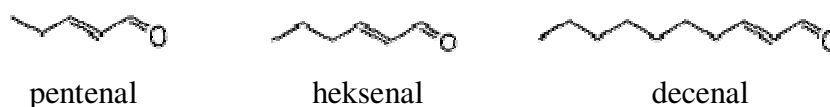
Citral (Slika 7) je prirodna mješavina geraniala i nerala, geometrijskih izomera, koji posjeduju snažno fungistatsko i fungicidno djelovanje. Općenito, inhibitorni učinak citrala i sličnih komponenti kao što su citronelal i  $\alpha$ -pinen na stanicu plijesni uključuje granulaciju

citoplazme, puknuće citoplazmatske membrane i inaktivaciju i/ili inhibiciju sinteze intracelularnih i ekstracelularnih enzima (Garcia i sur., 2008).



Slika 7: Strukturna formula citrala

Nezasićeni aldehidi strukturno slični citralu: heksenal, decenal, pentenal (Slika 8) također posjeduju antifungalnu aktivnost (Moleyar i sur., 1986). Autori smatraju da CHO grupa nezasićenih aldehida (heksenal, decenal, pentenal) konjugirana s dvostrukom vezom lanca može biti mjesto antifungalne aktivnosti. Ovakve molekule su snažni elektrofilni, što bi moglo značiti da povećanje elektrofilnosti povećava i antifungalnu aktivnost (Moleyar i sur., 1986).



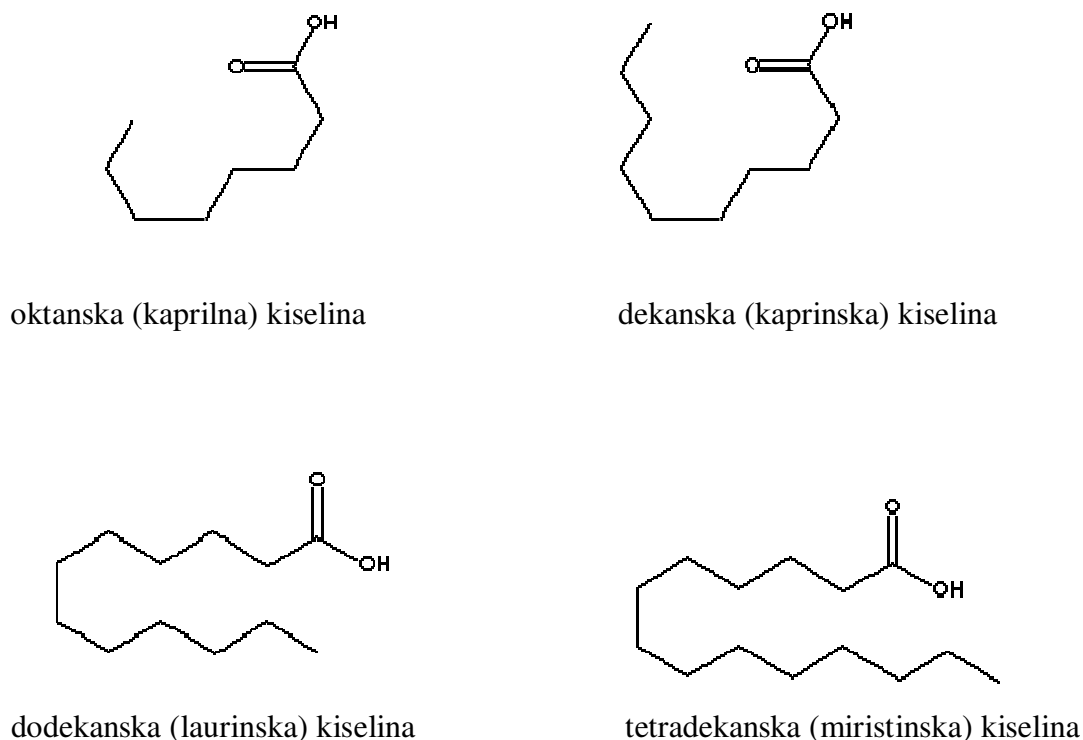
Slika 8: Strukturne formule pentenala, heksenala i decenala

Europska komisija je registrirala brojne sastojke eteričnih ulja (timol, eugenol, karvakrol, citral, heksenal, pentenal, decenal) kao poboljšivače okusa u hrani (Official Journal of the European Communities No 217/1999; 32/2002).

### 2.2.3.3. Masne kiseline i mehanizam djelovanja

Masne kiseline i njihovi monogliceridi posjeduju antibakterijska svojstva (Kabara i sur., 1972; Ouattara i sur., 1997; Skřivanová i sur., 2005) te antiviralne (Thormar i sur., 1987) i antifungalne osobine (Bergsson i sur., 2001; Riháková i sur., 2002; Walters i sur., 2003;

Altieri i sur., 2009). Ova svojstva su naročito uočena kod masnih kiselina srednjeg lanca (Slika 9) i njihovih monoglicerida (Bergsson i sur., 2001).



Slika 9: Strukturne formule masnih kiselina srednjeg lanca

Izvori masnih kiselina mogu biti prirodnog podrijetla: kokosovo ulje sadrži 4,9% oktanske i 6,2% dekanske kiseline (Ghosh i sur., 1997), dok ulje muškarnog oraščića sadrži 46% tetradekanske, 11% oktanske i 5% dekanske kiseline (Spricigo i sur., 1999). Dodekanska kiselina je široko rasprostranjena u mastima sjemenki porodice *Lauraceae* (Walters i sur., 2003). To je dominantna masna kiselina u cimetovom ulju (80–90%), kokosovom ulju (41–56%) i ulju palminih koštica (41–55%) (Gunstone i sur., 1994). Novi potencijalni izvor dodekanske kiseline je uljana repica (*Brassica napus* L.) koja može biti genetski modificirana da producira velike količine ulja s ovom kiselinom (Walters i sur., 2003).

Istraživanja su dokazala kako je dodekanska kiselina i njezini derivati, najinhibitornija zasićena masna kiselina protiv gram-pozitivnih organizama (Kabara i sur., 1972), a karakterizira je i snažno antifungalno djelovanje (Riháková i sur., 2002; Walters i sur., 2003;

Altieri i sur., 2009). Bergson i sur. (2001) su utvrdili kako oktanska i dodekanska kiselina aktivno ubijaju stanice *Candida albicans*.

Riháková i sur. (2002) u svom istraživanju su ispitali učinkovitost monoacilglicerola (monolaurin) iz kokosovog ulja na germinaciju spora i micelijski rast *Aspergillus niger*. Obzirom da kokosovo ulje sadrži 90% zasićenih masnih kiselina (45-48% dodekanske te 30-36% oktanske, dekanske i tetradekanske kiseline), a zbog visoke cijene pripreme čistih supstancija, autori su pripremili acil-glicerol iz kokosovog ulja i dokazali da se monolaurin iz kokosovog ulja može koristiti kao antifungalni agens umjesto lauroil-glicerola.

Walters i sur. (2003) su ispitali učinak dodekanske kiseline na biljne patogene *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* i *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Najveću inhibiciju rasta je pokazao tretman s 500  $\mu$ M dodekanske kiseline koja je reducirala micelijski rast *Rhizoctonia solani* i *Pythium ultimum* za 90%. Dodekanska kiselina na klijancima ječma u koncentraciji od 250  $\mu$ M i većim dovela je do značajne redukcije *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*.

Učinkovitost masnih kiselina i njihovih monoglicerida na *Fusarium* sp. *in vitro* ispitivali su Altieri i sur. (2009). U njihovim istraživanjima dodekanska kiselina je reducirala rast *F. oxysporium* u koncentraciji od 50 ppm, dok je učinak monolaurina bio neznatan. Isti učinak je primijećen i kod *F. avenaceum*. Tetradekanska kiselina i monomiristin su pokazali najveću antifungalnu učinkovitost pri najvišoj koncentraciji (40 ppm) i nešto bolji učinak je primijećen kod *F. oxysporium* nego kod *F. avenaceum* (Altieri i sur., 2009).

Poznato je da određene masne kiseline posjeduju fungistatske i fungicidne osobine (Chadeganipour i sur., 2001). Istraživanja su pokazala kako su dugački lanci nezasićenih masnih kiselina imaju bolje antifungalno djelovanje od zasićenih ili razgranatih lanaca (Chadeganipour i sur., 2001). Hidrofobne grupe zasićenih masnih kiselina igraju bitnu ulogu u njihovoj bioaktivnosti (Brannen i sur., 1980). Duži lanci masnih kiselina povećavaju hidrofobnost i tako smanjuju njihovu topivost u vodenim sistemima (Ouattara i sur., 1997), a najbolji balans hidrofobnih i hidrofilnih grupa ima dodekanska kiselina (Brannen i sur., 1980). Antimikrobna aktivnost masnih kiselina ovisna je o pH vrijednosti. Pretpostavlja se da nedisocirane masne kiseline lako penetriraju u lipidnu membranu bakterijske stanice gdje disociraju u alkalnom okruženju (Skřivanová i sur., 2005).

Mehanizam djelovanja na gljive nije u potpunosti jasan, ali moguće je da masne kiseline oštećuju plazma membranu gljiva (Walters i sur., 2003). Istraživanja su pokazala kako različite vrste gljiva imaju različitu osjetljivost na masne kiseline s različitim brojem ugljikovih atoma (Chadeganipour i sur., 2001). Avis i sur. (2001) su utvrdili kako je glavno

mjesto napada cis-9-hepta dekanske kiseline lipidni sloj fungalnih membrana. Veće doze ove kiseline uzrokovale su promjene u permeabilnosti membrane, što uzrokuje oslobađanje intracelularnih elektrolita i proteina i na kraju dovodi do dezintegracije citoplazme micelija i spora. Spore i miceliji gljiva imaju različiti kemijski sastav i tvrdoću stanične stijenke kao i različite enzime koji iniciraju germinaciju (Chadeganipour i sur., 2001). Transmisijska elektronska mikroskopija u studiji Bergsson i sur. (2001), u kojoj je ispitan učinak dodekanske kiseline na *C. albicans*, pokazuje dezorganiziranost citoplazme koja je najvjerojatnije nastala promjenama u hidrostatskim turgoru stanice zbog oštećenja ili dezintegracije plazme membrane, a to se možda dešava i u gljivama biljnim patogenim (Walters, 2003).

Europska komisija registrirala je masne kiseline (npr. oktanska, dekanska, dodekanska, tetradekanska kiselina, i dr.) kao poboljšivače okusa u hrani i smatra se kako ne predstavljaju opasnost za javno zdravlje (Official Journal of the European Communities No 217/1999; 32/2002).

### **3. MATERIJALI I METODE**



Dosadašnja istraživanja inhibitornog učinka sintetskih i prirodnih antioksidanasa te masnih kiselina obuhvatila su istraživanja na umjetnim hranjivim podlogama ili je kao supstrat korišteno zrnje žitarica. Nedostaju istraživanja inhibitornog djelovanja navedenih tvari na rast *F. graminearum* i *F. verticillioidea* i sintezu njihovih toksina u gotovim krmnim smjesama što će biti obuhvaćeno ovim radom.

Prilikom uskladištenja krmnih smjesa u silosima i skladištima može doći do povećanja vlažnosti i temperature u mikroregijama uskladištenog materijala. Ovaj pokus je simulirao takvu situaciju tako što su sterilne krmne smjese hidratizirane do dvije razine aktiviteta vode: 0,95 i 0,98. Ispitan je učinak smjesa tvari antioksidanasa (sintetskih i prirodnih) i masnih kiselina, različitih koncentracija, koje su umiješane u krmne smjese, nakon čega je provedena umjetna inokulacija istih odabranim vrstama roda *Fusarium*. Tijekom porasta plijesni na krmnim smjesama svakodnevno je praćen rast kolonija. U kombinacijama antifungalnih tvari, najučinkovitijim u inhibiciji porasta *Fusarium* sp., određen je sadržaj mikotoksina na kraju perioda inkubacije.

### **3.1. Čiste kulture rodova *Fusarium***

U pokusima su korištene čiste kulture rodova *Fusarium*, koji su se pokazali kao dobri producenti trihotecena tipa B: *Fusarium graminearum* Schwabe 110250 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska) i fumonizina B: *Fusarium verticilloides* M-1325 (Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, Penn State University, SAD). Čiste kulture *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioidea* uzgojene su u petri pločama na krumpir-dekstroznom agaru (potato dextrose agara, BioLife) (Marin i sur., 1998b) na temperaturi od  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  tijekom pet dana.

### **3.2. Krmne smjese**

Krmne smjese lokalnog proizvođača stočne hrane, SK-D-N (za krmače dojilje i neraste) i PPT- 2 (za tov pilića u porastu) su sterilizirane gama zrakama od 12 kGrea (Lee i sur., 2000; Ramirez i sur., 2006) na Institutu Ruđer Bošković, Zagreb. Sastav ovih krmnih smjesa prikazan je u Tablicama 3 i 4. Početni sadržaj vlage u stočnoj hrani PPT-2 bio je 11,06% ( $a_w=0,632$ ), a u stočnoj hrani SK-D-N 12,09% ( $a_w=0,619$ ). Željeni aktivitet krmnih smjesa (0,95 i 0,98) određen je prema krivulji adsorpcije vlage za svako krmivo (Marin i sur.,

1995a). Aktivitet vode u smjesi je provjeravan s uređajem za mjerenje aktiviteta vode (HygroPalm AW1, Rotronic).

Tablica 3: Sastav krmne smjese PPT-2

<b>PPT-2</b>	<b>% smjese</b>
kukuruz	51,125
soja – tostirana	19
soja – sačma	20
kvasac	1,875
mast	2,5
metionin	0,15
lizin	0,15
vezač	1,25
sol	0,125
stočna kreda	1,7
fosfonal forte	1,125
premiks vitamina	1

Tablica 4: Sastav krmne smjese SK-D-N

<b>SK-D-N</b>	<b>% smjese</b>
kukuruz	45,7
ječam	15
stočno brašno	15
dehidrirana lucerna	2,5
soja – sačma	15
kvasac	2,5
lizin	0,1
sol	0,5
kalcitno brašno	2
fosfonal forte	1,2
premiks vitamina	0,5

### 3.3. Antioksidansi i masne kiseline

U istraživanjima su ispitani:

1. Sintetski antioksidansi: butilirani hidroksianisol – BHA (p.a., 98%), propil paraben – PP (p.a., 99%), butilirani hidroksitoluen – BHT (p.a., 99%), propil galat – PG (p.a., 98%), tert-butilhidrokinon –TBHQ (p.a., 98%), etoksikvin – E (p.a., 75%), selenit (p.a., 98%).

2. Prirodni antioksidansi tj. sastojci eteričnih ulja: timol – T (p.a., 99,5%), karvakrol – K (p.a., 97%), eugenol – EUG (p.a., 99%), citral – C (p.a., 98%), heksenal – H (p.a., 97%), decenal – D (p.a., 95%), pentenal – P (p.a., 95%).

3. Masne kiseline: oktanska – C8 (p.a., 98%), dekanska – C10 (p.a., 98%), dodekanska – C12 (p.a., 98%), tetradekanska – C14 (p.a., 98%), natrij-oktanoat – NaC8 (p.a., 98%).

Navedene tvari su pribavljene od Sigma-Aldrich Chemie i Fluka Chemie.

### **3.4. Priprema smjese antioksidanasa i masnih kiselina**

Antioksidansi, sastojci eteričnih ulja i masne kiseline su odvagane na analitičkoj vagi (Mettler Toledo AB 204-S, preciznosti 0,1 mg) u sterilnim uvjetima u plastične sterilne posude s hermetičkim poklopcem i otopljene/dispergirane u 95% alkoholu, deioniziranoj vodi i 10% Tweenu 80 (polioksietilen-20-sorbitan monoleat, Sigma-Aldrich) (9:2:2, v/v/v) koji su prethodno sterilizirani na 121°C, 15 minuta. Mješavine antifungalnih tvari su sadržavale različite koncentracije pojedinačnih sastojaka, od 100 do 300 ppm antioksidanasa i sastojaka eteričnih ulja, te od 300 do 1000 ppm masnih kiselina.

### **3.5. Umješavanje antifungalnih smjesa tvari u krmne smjese**

Krmne smjese su razvagane aseptički u sterilne laboratorijske staklene boce od 1000 ml, i u biozaštitnom kabinetu umiješane su antifungalne mješavine u krmne smjese. Nakon dobre homogenizacije krmnih smjesa provedena je hidratizacija sterilnom deioniziranom vodom do željenog aktiviteta vode (0,95 i 0,98) prema krivulji adsorpcije vlage za određeno krmivo (Marin i sur., 1998c), nakon čega su smjese dodatno homogenizirane. Kontrolne probe su sadržavale samo krmne smjese i vodu. Aktivitet vode u smjesi je provjeren aw-metrom (HygroPalm AW1, Rotronic). Boce su zatim pohranjene sljedećih 48 h na 4°C zbog uravnoteženja vlage i antifungalnih mješavina tvari, uz povremeno protresivanje (Torres AM i sur., 2003).

### **3.6. Inokulacija krmnih smjesa**

Nakon uravnoteženja, krmne smjese su u sterilnim uvjetima razvagane (20 g) u petrijeve zdjelice (Torres AM i sur., 2003; Ramirez i sur., 2006). Inokulacija je provedena s pet dana starom čistom kulturom poraslom na krumpir-dekstroznom agaru, micelijskim

diskom promjera 7 mm (Marin i sur., 1995a; Torres AM i sur., 2003). Petrijeve zdjelice su stavljene u plastične vrećice koje su sadržavale otopinu NaCl istog aktiviteta vode kao i krmna smjesa kako bi se u okruženju unutar vrećice osigurala konstantno ista relativna vlažnost (Torres AM i sur., 2003; Velluti i sur., 2004a). Kontrolna krmiva i krmiva s određenom kombinacijom tvari su nacijepljena u tri ponavljanja.

### **3.7. Inkubacija krmnih smjesa**

Petri ploče su inkubirane na  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  u termostatskom kabinetu (AL 500-8, Aqualytic). Svakodnevno je praćen porast plijesni na krmnoj smjesi izmjeravanjem dva promjera kolonije pod pravim kutom (Marin i sur., 1995a; Ramirez i sur., 2006), dok kolonija nije dosegla rub petrijeve zdjelice. Fungalni porast je korišten za računanje stope rasta.

### **3.8. Određivanje mikotoksina**

Nakon što je kolonija dosegla rub petrijeve zdjelice, uzorci su osušeni na  $50^{\circ}\text{C}$  (Ramirez i sur., 2006) tijekom 48 h te usitnjeni u laboratorijskom mlinu (M 20, Ika) do veličine čestica od  $20\ \mu\text{m}$ . Uzorci su čuvani na  $-20^{\circ}\text{C}$  do konačne analize mikotoksina.

Postupak ekstrakcije uzoraka za analizu mikotoksina rađen je prema standardnom postupku Vicam i Romer Labs.

#### **3.8.1. Analiza trihotecena tipa B**

Određivanje trihotecena tipa B uključilo je ekstrakciju iz uzorka, prečišćavanje SPE (solid-phase extraction-ekstrakcija na čvrstoj fazi) kolonama i određivanje na HPLC (high performance liquid chromatography) uređaju.

Napravljena je kalibracija primjenom standarda poznatih koncentracija (od 0,337 do 10,11 ppm DON-a, od 0,338 do 10,13 ppm NIV-a, od 0,339 do 10,17 ppm 3-AcDON-a i 15-AcDON-a) uz  $r=0,999908$ . Određeno je iskorištenje (recovery) propuštanjem otopine poznate koncentracije (0,675 ppm nivalenola, 0,674 ppm deoksinivalenola, 0,678 ppm 3-AcDON-a i 0,678 ppm 15-AcDON-a-) kroz SPE kolone i iznosio je 66,5% za NIV, 89,6% za DON, 88,6% za 3-AcDON i 101,3 % za 15-AcDON. Sva mjerenja su uključivala minimalno dva ponavljanja.

### **3.8.1.1. Prečišćavanje SPE kolonama**

MultiSep 227 Trich+ (Romer Labs) kolone sadrže kombinaciju adsorbensa koji zadržavaju nečistoće, dok trihoteceni tipa A i B prolaze.

Uzorak za analizu je samljeven da 95% uzorka prolazi kroz sito od 20 µm. Zatim je odvagano 6 g uzorka, u odvagu je dodano 100 ml smjese acetonitrila i vode (84+16, v+v), smjesa je prenijeta u mikser i miješana je velikom brzinom tri minute. Ekstrakt je profiltriran u čašu. Na vakuum manifold postavljene su SPE kolone i propušteno je 10 ml filtrata kroz kolonu. Zatim je 3,5 ml eluata preneseno u kivetu koje su postavljene u suhi otparivač pri temperaturi od oko 70°C. Otpareni uzorci su rekonstituirani s 300 µL mobilne faze acetonitril:voda (1:9, v/v). Injektirano je 50 µL rekonstituiranog uzorka u HPLC.

### **3.8.1.2. HPLC uvjeti**

Korišten je sustav ProStar 330 s PDA detektorom i ProStar 230 ternarna pumpa (Varian).

HPLC uvjeti: kolone: reverzno-fazna: 4,6 x 75 mm (3 µm) i 3 x 250 (5 µm); mobilna faza: acetonitril:voda (10:90); protok: 0,6 ml/min; injektirani volumen: 50 µl; lampa: deuterijska; detekcija: 218 nm; uzorkovna petlja: 200 µl; opseg: 0,005; atenuacija: 8. Kromatogrami su snimani na valnoj duljini 218 nm, a spektri na valnoj duljini 200-400 nm.

## **3.8.2. Analiza fumonizina**

Napravljena je kalibracija primjenom standarda poznatih koncentracija (od 0,200 do 5,00 ppm FB1 i FB2) uz  $r=0,9999$  za oba mikotoksina. Određeno je iskorištenje propuštanjem otopine poznate koncentracije (za FB1 5,914 ppm, 3,062 ppm i 1,219 ppm; za FB2 5,808 ppm, 2,946 ppm i 1,200 ppm) kroz imunoafinitetne kolone i iznosio je za FB1 od 86,74-103,63% a za FB2 83,67-101,50%. Sva mjerenja su uključivala minimalno dva ponavljanja.

### **3.8.2.1. Prečišćavanje imunoafinitetnim kolonama**

FumoniTest<sup>TM</sup> imunoafinitetne kolone (Vicam) sadrže specifična antitijela za fumonizine za koje se oni prolaskom kroz kolonu vežu. Zaostale nečistoće se zatim ispiru s

kolone. Propuštanjem metanola fumonizini se odstranjuju s antitijela kolone i prelaze u otapalo.

Uzorak za analizu je samljeven da 95% uzorka prolazi kroz sito od 20  $\mu\text{m}$ . Potrebnoj odvagi uzorka (oko 1 g) je dodano 5 g NaCl. Odvage su prenijete u mikser, dodano je 100 ml metanol:voda (80:20, v/v) i miješano je velikom brzinom 5 minuta. Ekstrakt je filtriran kroz nabrani filter papir. Prenešeno je 10 ml filtrata u čašu i razrijeđeno s 40 ml otopine PBS. Otopina PBS sadrži 8,0 g NaCl, 1,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g KCl, što je otopljeno u otprilike 990 ml deionizirane vode, pH otopine je podešen na 7,0 s koncentriranom HCl i nadopunjeno do 1000 ml deioniziranom vodom. Ekstrakt je profiltriran kroz filter od mikrovlakana ( $r = 11 \text{ cm}$ ,  $1,5 \mu\text{m}$ ).

Imunoafinitetna kolona je pripremljena na taj način da je odstranjen poklopac kolone i odsječeno oko 3 mm s vrha te je poklopac vraćen na kolonu na koju je umetnuta staklena kolona (tzv. rezervoar otapala). Kolona je namještena na vakuum manifold i uključena je vakuum pumpa pomoću koje je podešena brzina protjecanja tekućine (broj kapi u sekundi).

Propuštano je 10 ml zadnjeg filtrata kroz kolonu brzinom od 1-2 kapi u sekundi dok zrak nije prošao kroz kolonu. Nakon toga je propušteno 10 ml PBS otopine brzinom od 1-2 kapi u sekundi dok zrak nije prošao kroz kolonu. Odbačen je otpad koji je prošao kroz kolonu i postavljene su kivete u vakuum manifold. Propuštanje 1,5 ml metanola provedeno je brzinom od jedne kapi u sekundi ili gravitacijski. Eluat je na suhom otparivaču otparen do suha pri temperaturi od oko  $68^\circ\text{C}$ . Otpareni uzorak je resuspendiran s 200  $\mu\text{L}$  smjese metanol:voda (50:50, v/v).

### **3.8.2.2. Derivatizacijska reakcija i HPLC uvjeti**

Resuspendiranoj otopini uzorka (25  $\mu\text{L}$ ) dodano je 225  $\mu\text{L}$  derivatizacijskog reagensa te je nakon točno jedne minute injektirano 20  $\mu\text{L}$  u HPLC. Derivatizacijski reagens čine dvije otopine, otopina A sadržava 0,1 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ; otopina B tj. OPA reagens se dobije otapanjem 40 ml o-ftaldialdehida u 1 ml metanola što se razrijedi s 5 ml otopine A i doda se 50  $\mu\text{L}$  2-merkaptetanola, dobro promiješa i skladišti u mraku do tjedan dana na sobnoj temperaturi.

Korišten je sustav ProStar 330 s fluorescentnim detektorom i ProStar 230 ternarnom pumpom (Varian).

HPLC uvjeti: kolona: reverzno-fazna 3,9 x 15 mm (4  $\mu\text{m}$ ); mobilna faza: metanol : 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (77:23, v/v) namještena na pH 3,3 uz  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; protok: 0,8 ml/min; injektirani volumen: 20  $\mu\text{L}$ ; fluorescencijski detektor: ekscitacija na 335 nm, emisija na 440 nm.

### 3.9. Statistička obrada podataka

Porast micelijskog rasta bilježen je svakodnevno kroz inkubacijski period. Nakon perioda inkubacije, primjenom linearne regresije, određena je stopa rasta, koja predstavlja nagib pravca, tako što se promjer fungalne kolonije uvrstio nasuprot vremenu rasta (Etcheverry i sur., 2002; Torres AM i sur., 2003; Velluti i sur., 2004a; Ramirez i sur., 2006). Regresijski koeficijent (b) koji predstavlja stopu rasta (mm po danu) određen je pomoću jednadžbe pravca:

$$Y = a + bX$$

Y = zavisna varijabla (promjer kolonije)

a, b = koeficijenti

X = nezavisna varijabla (vrijeme inkubacije)

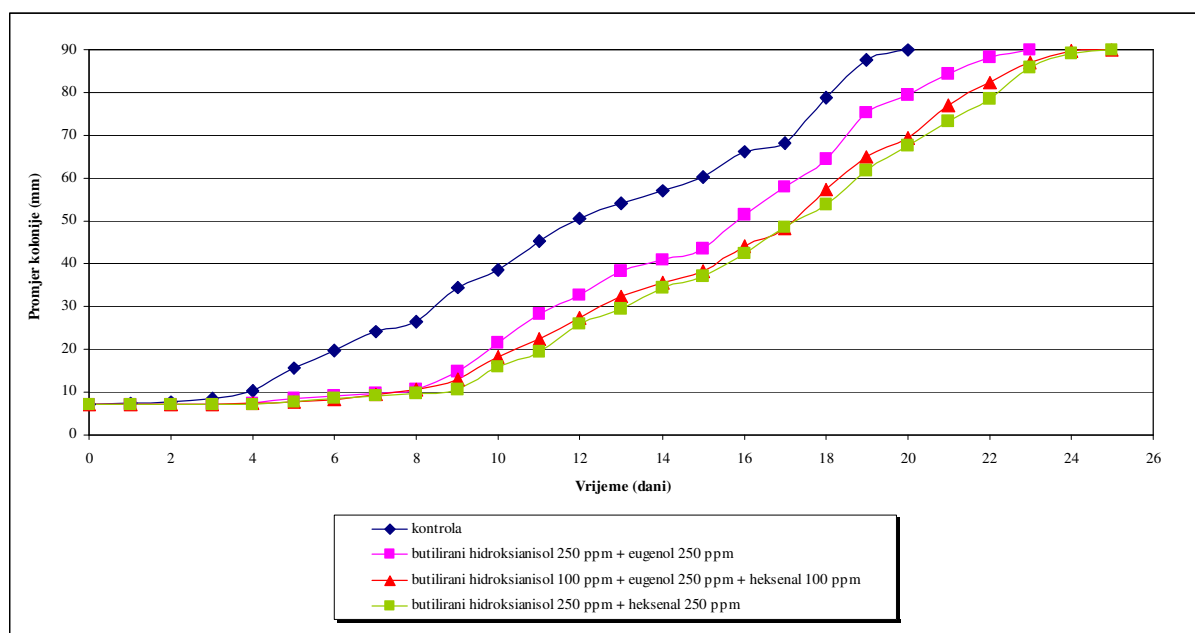
Lag faza je utvrđena ekstrapolacijom pravca na x osi za svako ponavljanje u svakom tretmanu (Etcheverry i sur., 2002; Torres AM i sur., 2003) te predstavlja vrijeme potrebno da promjer kolonije preraste 10 mm. U slučaju stagnirajućeg rasta kolonije korištena su samo prva tri dana stagnacije u izračunu stope rasta.

Razlike između stope rasta u ispitivanim antifungalnim kombinacijama i kontrole kao i razlike između koncentracija mikotoksina u tretiranom i netretiranom krmivu testirane su Studentovim t-testom. Za statističku analizu podataka korišteni su programski sustavi Excel 2003 (Microsoft) i Statistica 7 (StatSoft).

## **4. REZULTATI**



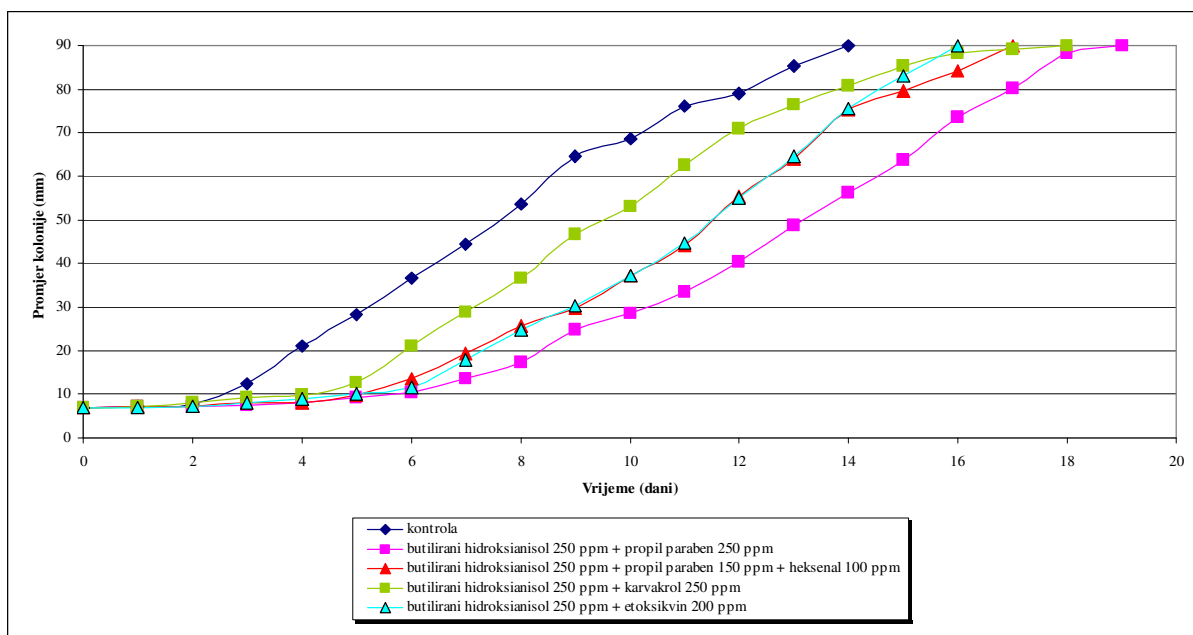
#### 4.1. Rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,95



Slika 10: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 5: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

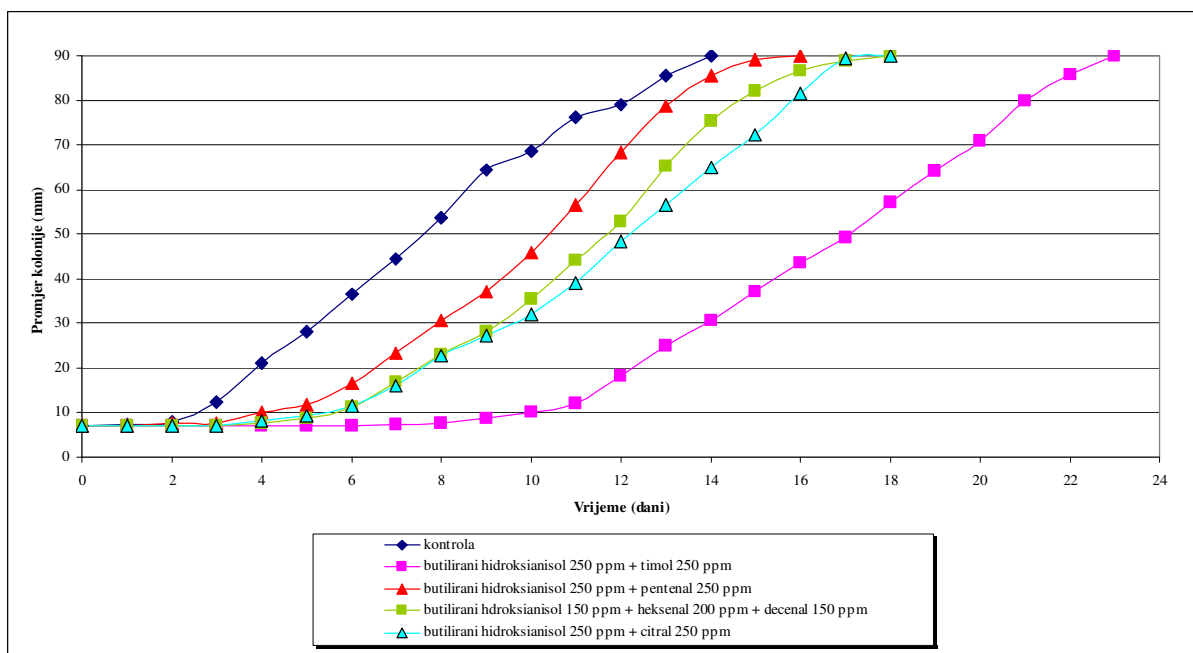
kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		4	4,4
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + eugenol	250+250	8	4,1
kombinacija 2 butilirani hidroksianisol + eugenol + heksenal	100+250+100	8	3,8
kombinacija 3 butilirani hidroksianisol + heksenal	250+250	9	3,7



Slika 11: Dnevni rast *Fusarium graminearuma* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 6: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearuma* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

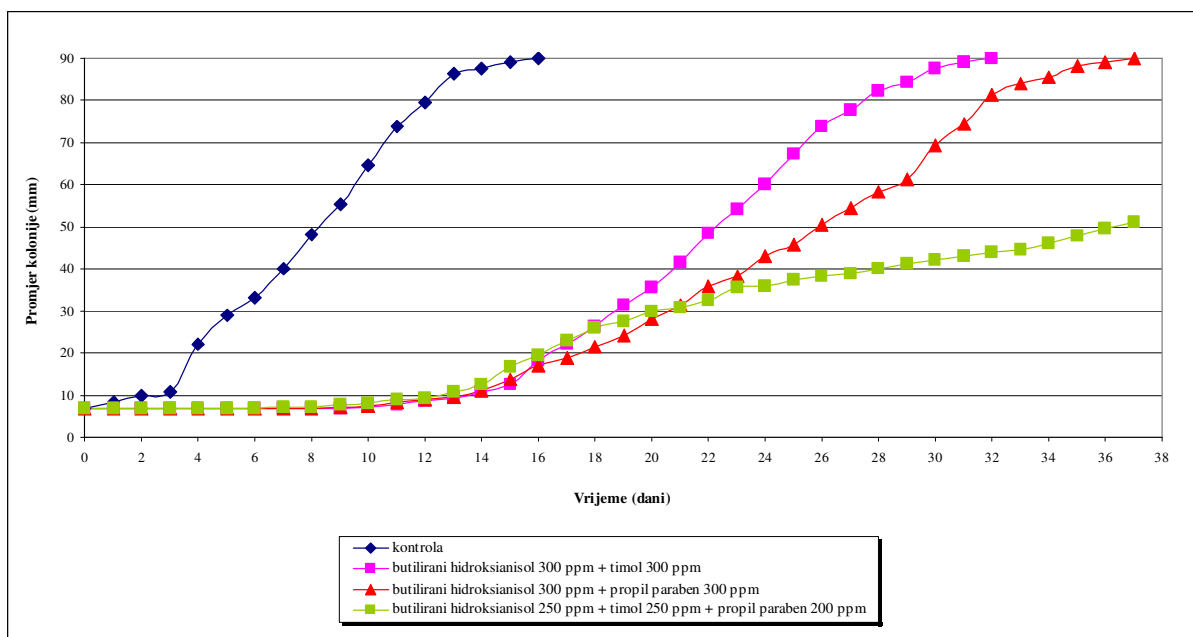
kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		2	6,8
kombinacija 4 butilirani hidroksianisol + propil paraben	250+250	6	4,8
kombinacija 5 butilirani hidroksianisol + propil paraben + heksenal	250+150+100	5	5,5
kombinacija 6 butilirani hidroksianisol + karvakrol	250+250	4	5,7
kombinacija 7 butilirani hidroksianisol + etoksikvin	250+200	5	5,5



Slika 12: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 7: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		2	6,8
kombinacija 8 butilirani hidroksianisol + timol	250+250	10	3,8
kombinacija 9 butilirani hidroksianisol + pentenal	250+250	4	6,1
kombinacija 10 butilirani hidroksianisol + heksenal + decenal	150+200+150	5	5,6
kombinacija 11 butilirani hidroksianisol + citral	250+250	5	5,2



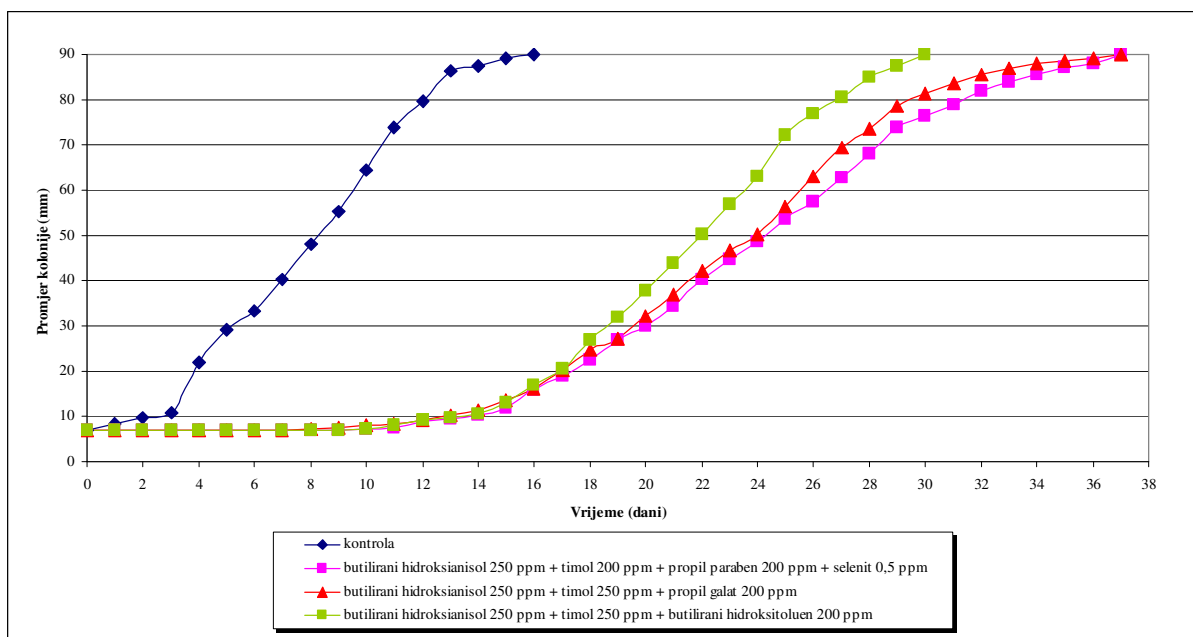
Slika 13: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 8: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		3	6,2
kombinacija 12 butilirani hidroksianisol + timol	300+300	14	3,0
kombinacija 13 butilirani hidroksianisol + propil paraben	300+300	13	2,6
kombinacija 14 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	250+250+200	13	1,4** <sup>a</sup>

\*\* stopa rasta značajno niža od kontrole,  $p < 0,01$

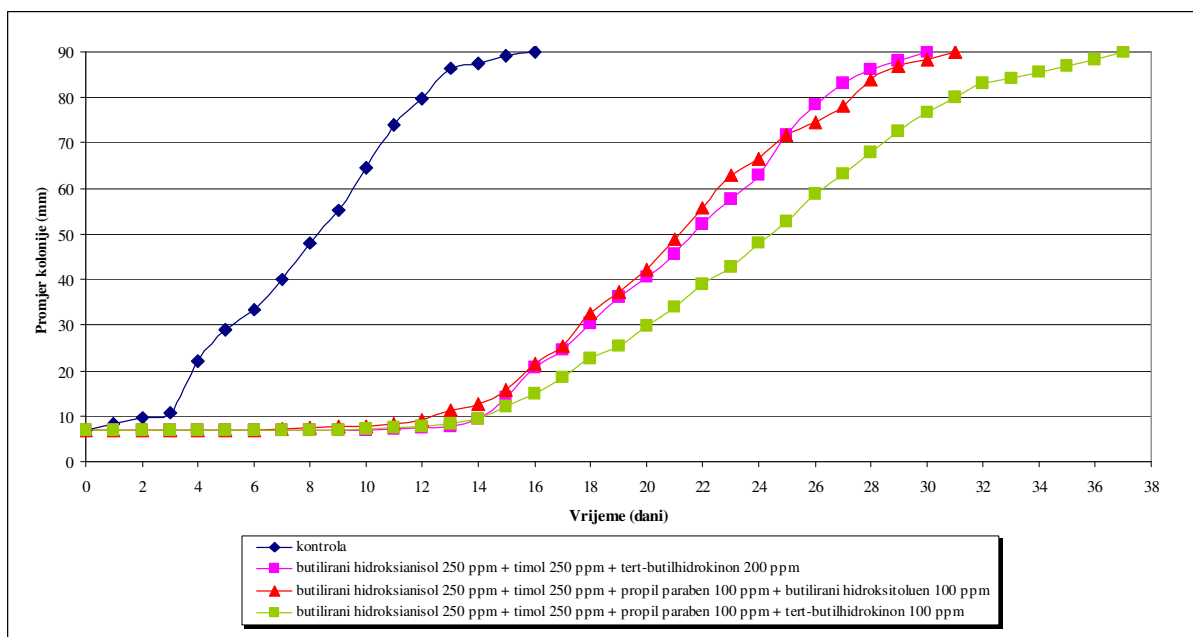
<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 51 mm



Slika 14: Dnevni rast *Fusarium graminearuma* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 9: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearuma* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

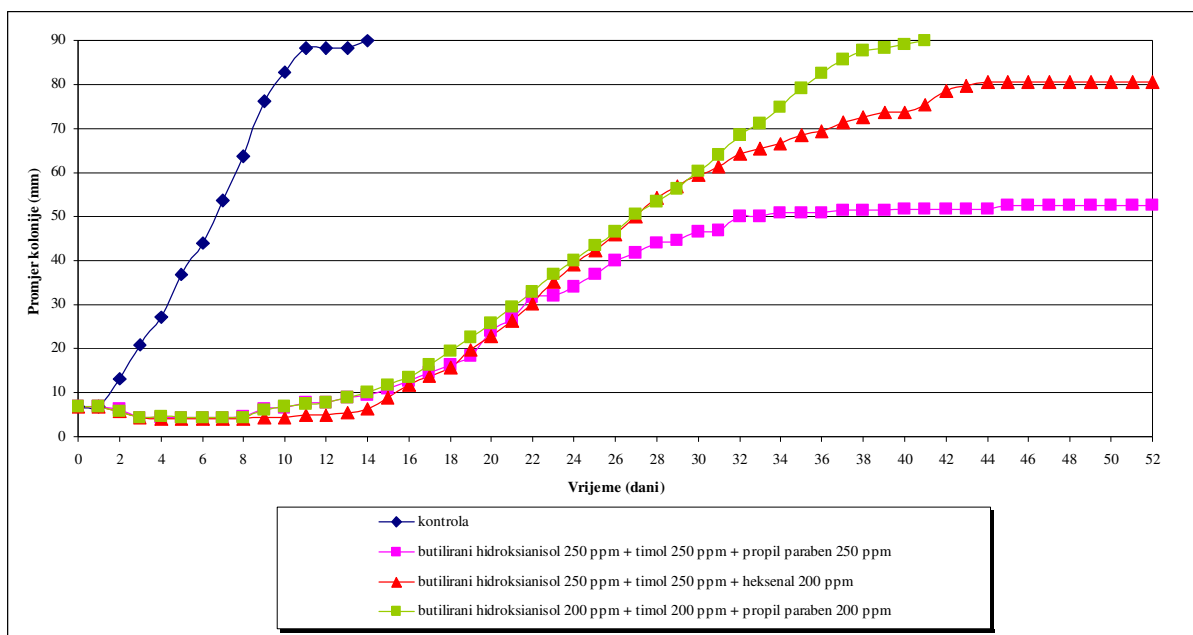
kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		3	6,2
kombinacija 15 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + selenit	250+200+200+0,5	14	2,7
kombinacija 16 butilirani hidroksianisol + timol + propil galat	250+250+200	13	2,8
kombinacija 17 butilirani hidroksianisol + timol + butilirani hidroksitoluen	250+250+200	14	3,0



Slika 15: Dnevni rast *Fusarium graminearuma* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 10: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearuma* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		3	6,2
kombinacija 18 butilirani hidroksianisol + timol + tert-butilhidrokinon	250+250+200	14	3,1
kombinacija 19 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + butilirani hidroksitoluen	250+250+100+100	12	3,1
kombinacija 20 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + tert-butilhidrokinon	250+250+100+100	14	2,7



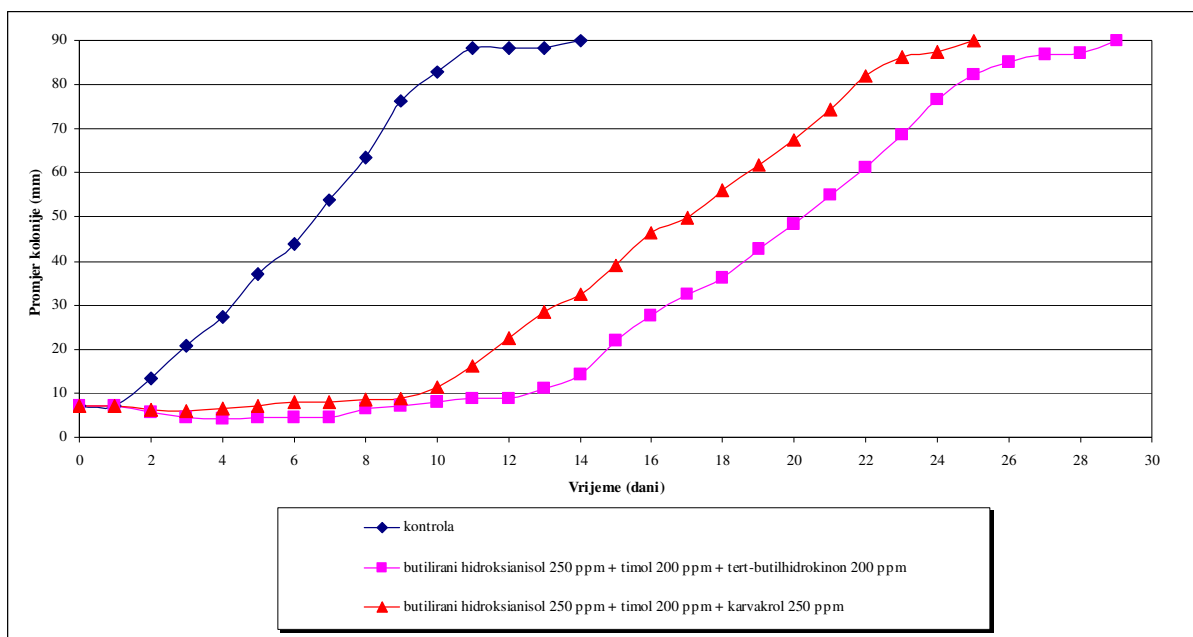
Slika 16: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 11: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
		1	7,1
kombinacija 21 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	250+250+250	14	1,4 <sup>*a</sup>
kombinacija 22 butilirani hidroksianisol + timol + heksenal	250+250+200	15	2,1 <sup>b</sup>
kombinacija 23 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200	14	2,4

\*stopa rasta značajno niža od kontrole, p <0,05

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 52 mm; <sup>b</sup> stagnacija rasta nakon 81 mm

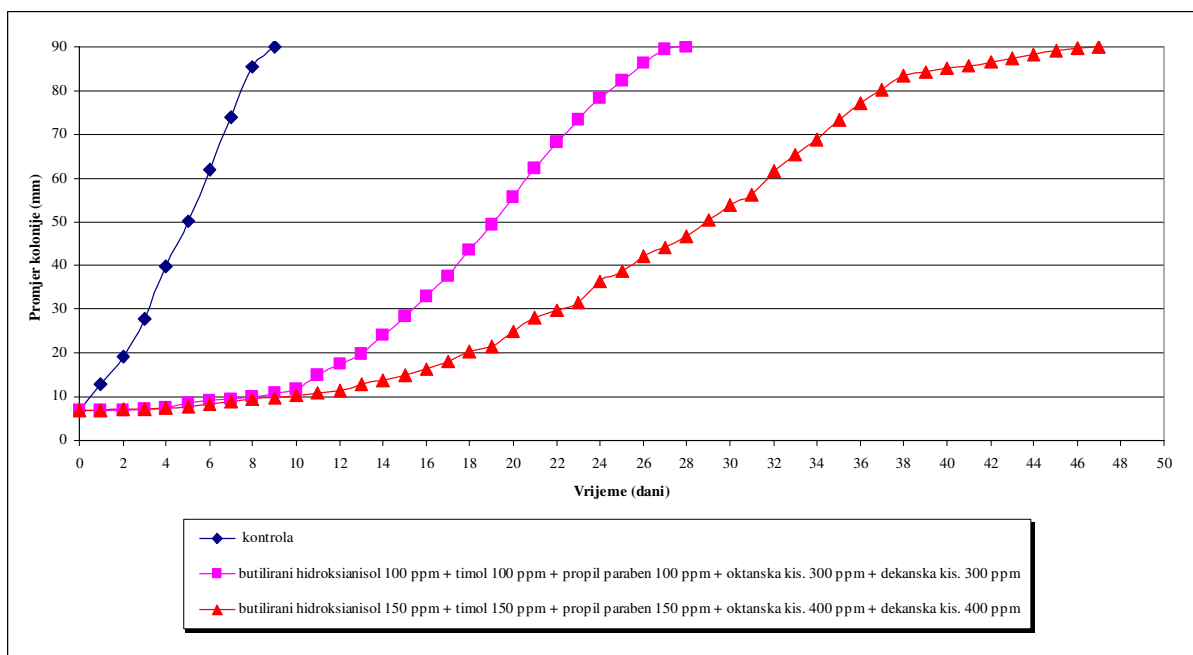


Slika 17: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri  $a_w$  0,95 i 25°C

Tablica 12: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri  $a_w$  0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	7,1
kombinacija 24 butilirani hidroksianisol + timol + tert-butilhidrokinon	250+200+200	12	3,4
kombinacija 25 butilirani hidroksianisol + timol + karvakrol	250+200+250	9	3,8

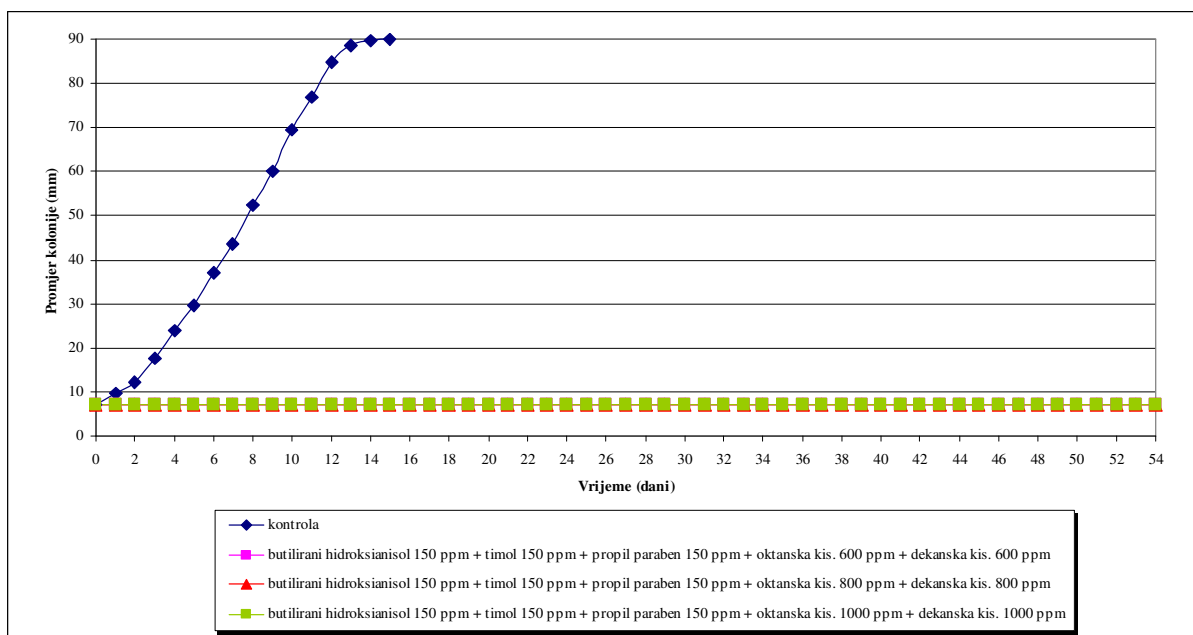




Slika 18: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 13: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

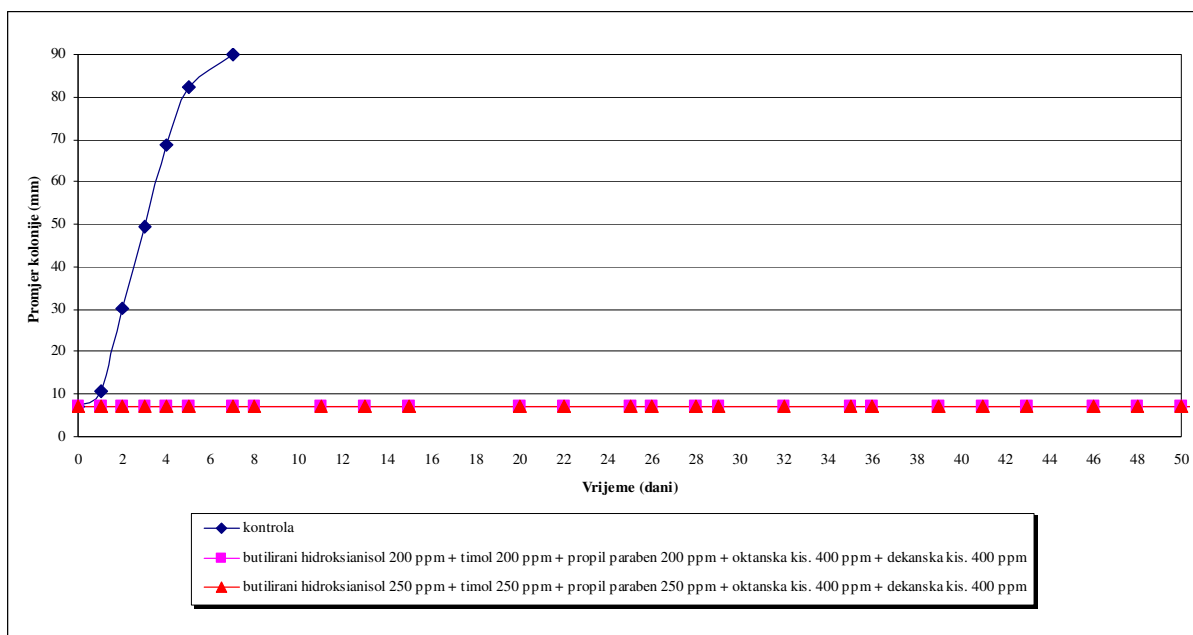
kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		0	9,9
kombinacija 26 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	100+100+100+300+300	9	3,4
kombinacija 27 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+400+400	10	2,2



Slika 19: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 14: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	6,4
kombinacija 28 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+600+600	54	0
kombinacija 29 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+800+800	54	0
kombinacija 30 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+1000+1000	54	0

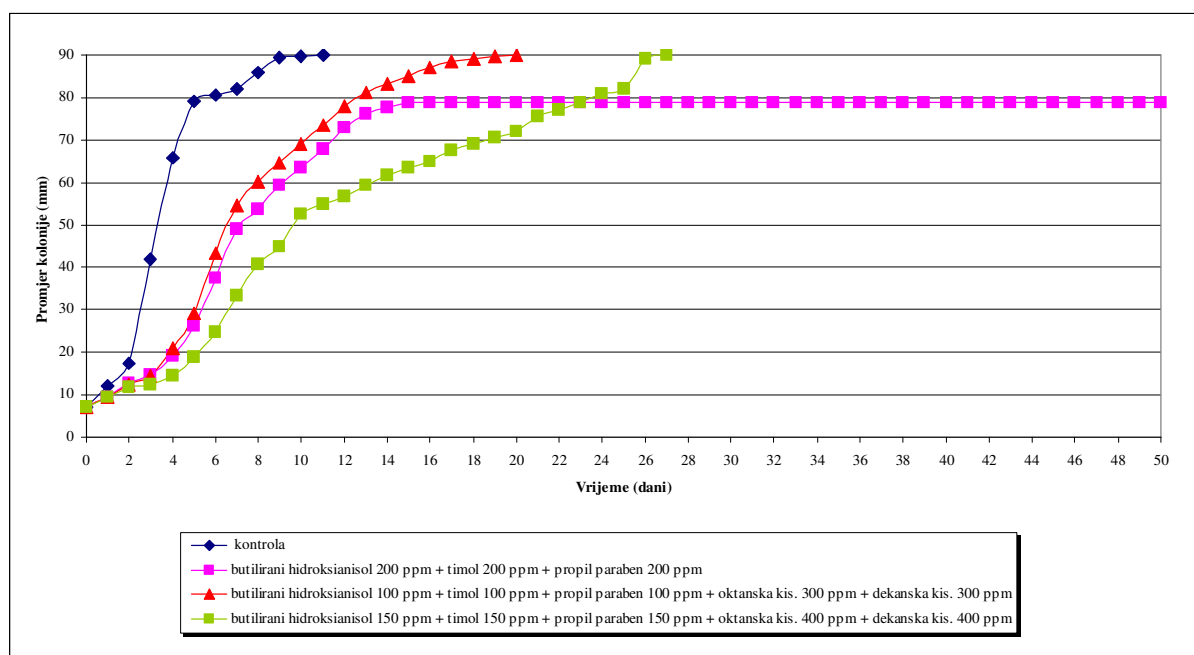


Slika 20: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 15: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	7,3
kombinacija 31 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis	200+200+200+400+400	56	0,0
kombinacija 32 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis.	250+250+250+400+400	56	0,0

## 4.2. Rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98

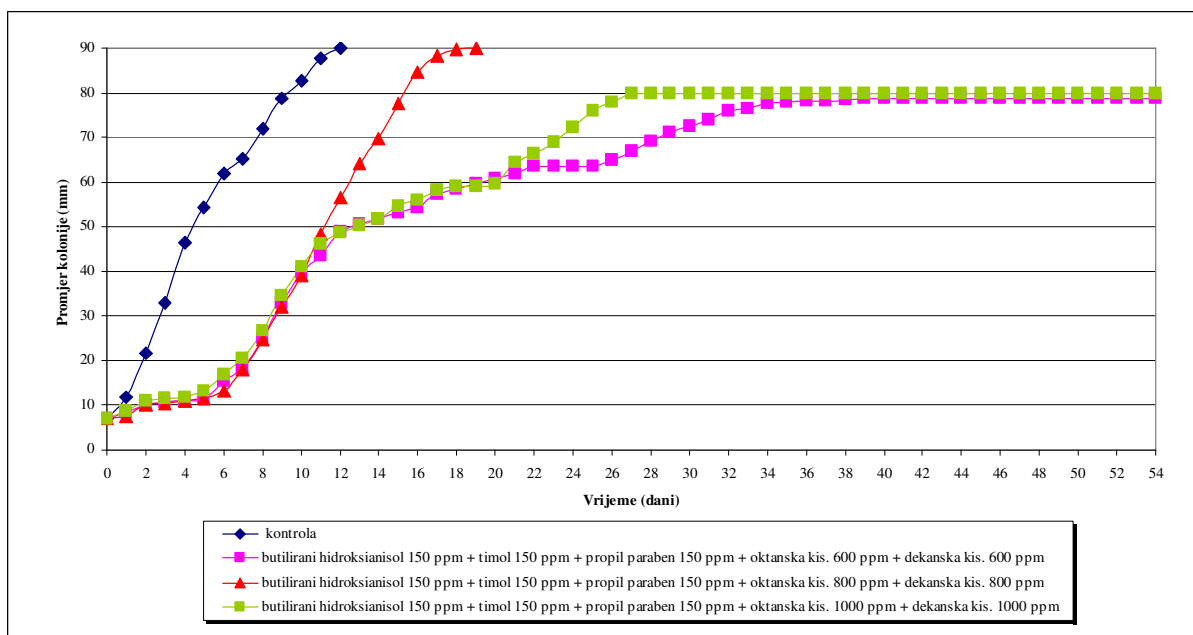


Slika 21: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 16: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		0	8,3
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200	1	5,0 <sup>a</sup>
kombinacija 2 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	100+100+100+300+300	1	4,7
kombinacija 3 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+400+400	1	3,1

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 79 mm

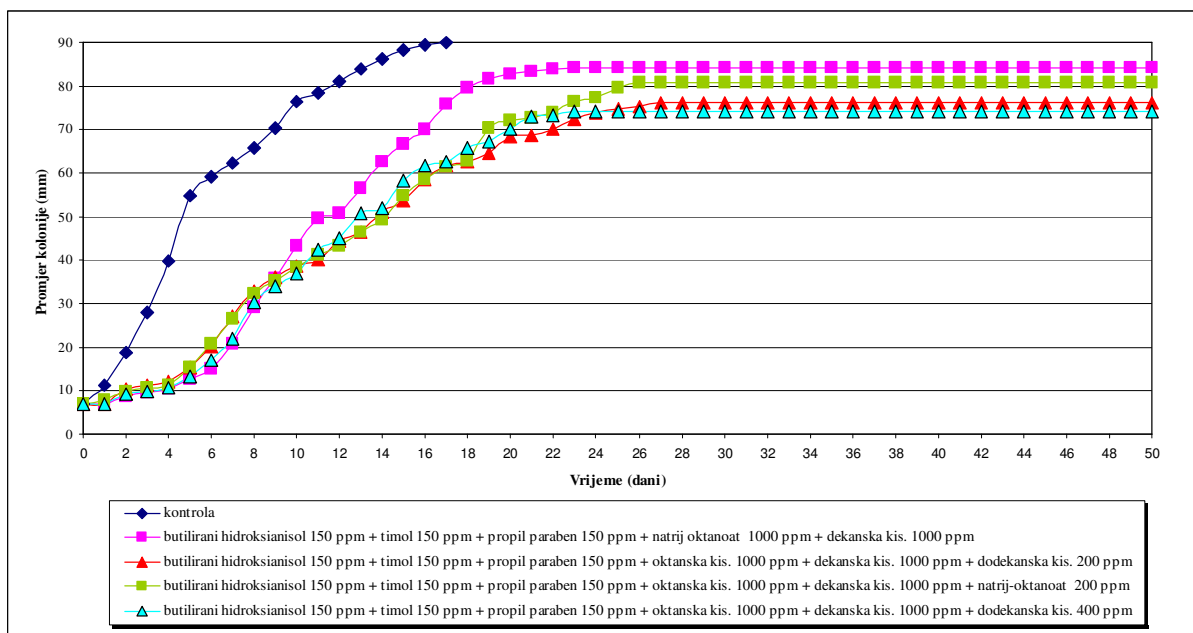


Slika 22: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 17: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		0	7,3
kombinacija 4 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+600+600	3	1,9 <sup>a</sup>
kombinacija 5 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+800+800	4	5,3
kombinacija 6 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+1000+1000	2	2,8 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 79 mm; <sup>b</sup> stagnacija rasta nakon 80 mm



Slika 23: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

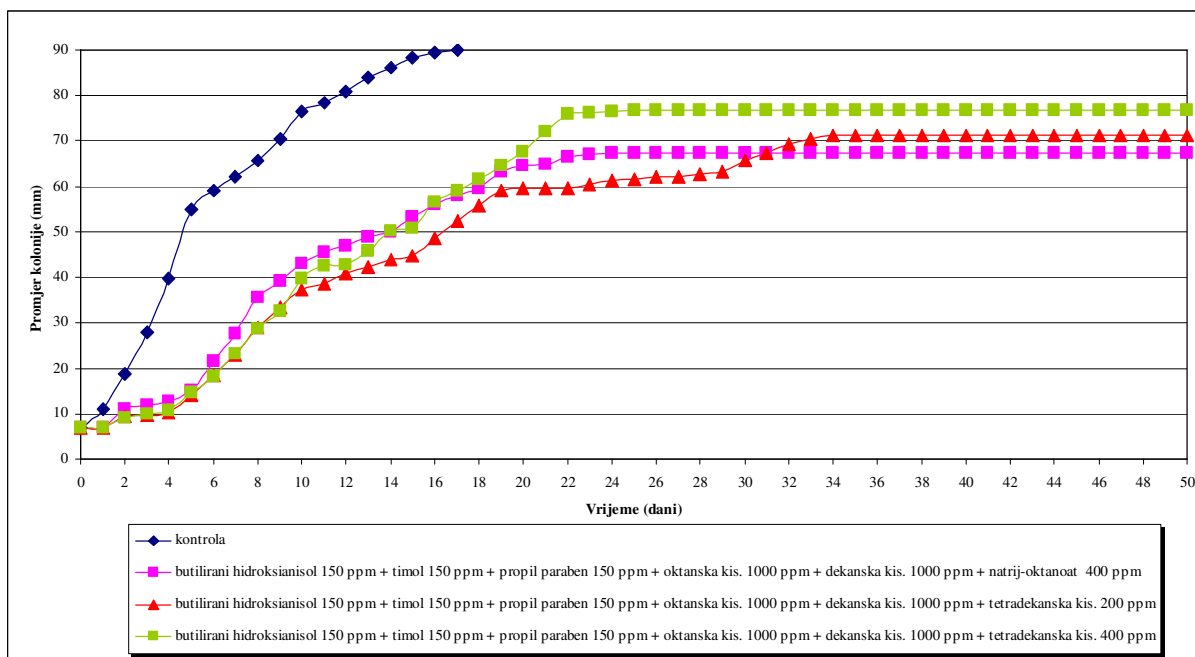
Tablica 18: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		0	5,0
kombinacija 7 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + natrij oktanoat + dekanska kis.	150+150+150+1000+1000	4	3,9 <sup>a</sup>
kombinacija 8 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis. + dodekanska kis.	150+150+150+1000+1000+200	2	2,7 <sup>b</sup>
kombinacija 9 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis. + natrij oktanoat	150+150+150+1000+1000+200	3	3,0 <sup>c</sup>
kombinacija 10 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis. + dodekanska kis.	150+150+150+1000+1000+400	4	3,2 <sup>*d</sup>

\* stopa rasta značajno niža od kontrole, p<0,05

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 84 mm; <sup>b</sup> stagnacija rasta nakon 76 mm; <sup>c</sup> stagnacija rasta nakon 81 mm;

<sup>d</sup> stagnacija rasta nakon 74 mm



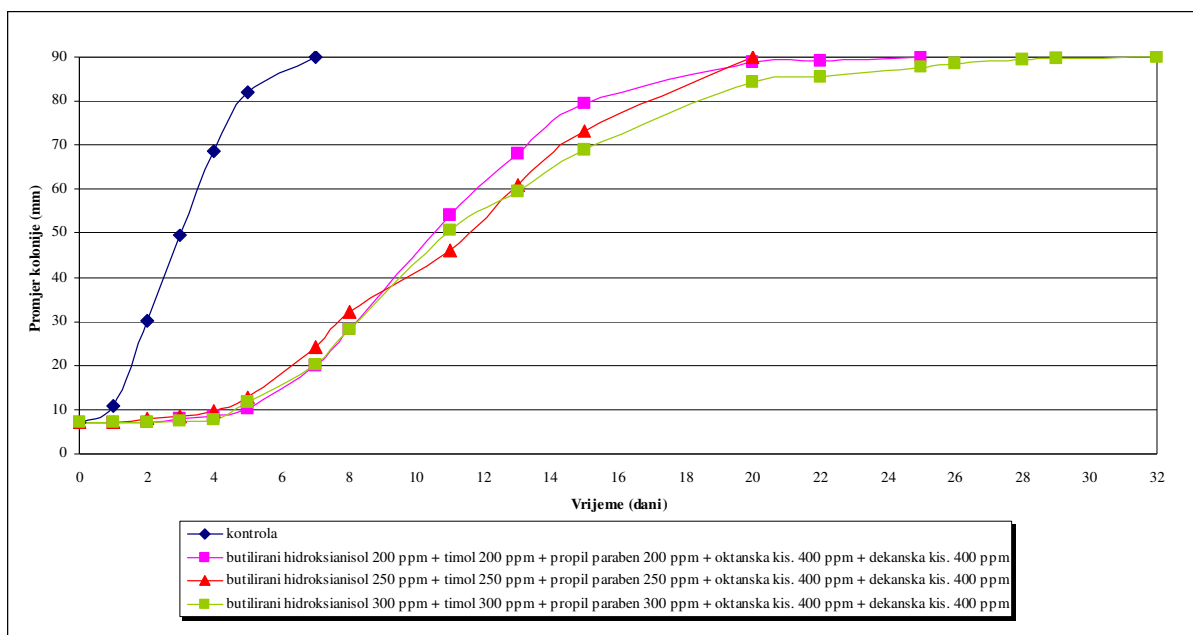
Slika 24: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 19: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		0	5,0
kombinacija 11 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis. + natrij oktanoat	150+150+150+1000+1000+400	1	2,5* <sup>a</sup>
kombinacija 12 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis. + tetradekanska kis.	150+150+150+1000+1000+200	4	1,9* <sup>b</sup>
kombinacija 13 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis.+ tetradekanska kis.	150+150+150+1000+1000+400	4	3,1 <sup>c</sup>

\* stopa rasta značajno niža od kontrole,  $p < 0,05$

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 67 mm; <sup>b</sup> stagnacija rasta nakon 71 mm; <sup>c</sup> stagnacija rasta nakon 77 mm

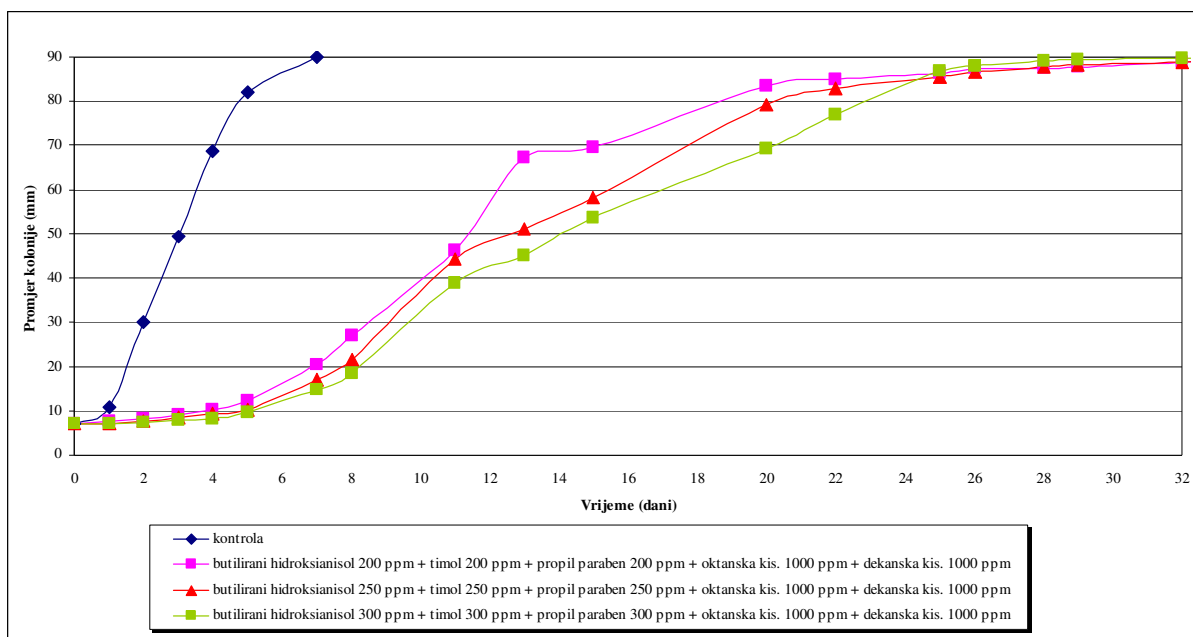


Slika 25: Dnevni rast *Fusarium graminearuma* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 20: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearuma* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	13,5
kombinacija 14 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+400+400	4	4,2
kombinacija 15 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+400+400	4	4,6
kombinacija 16 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	300+300+300+400+400	4	3,2





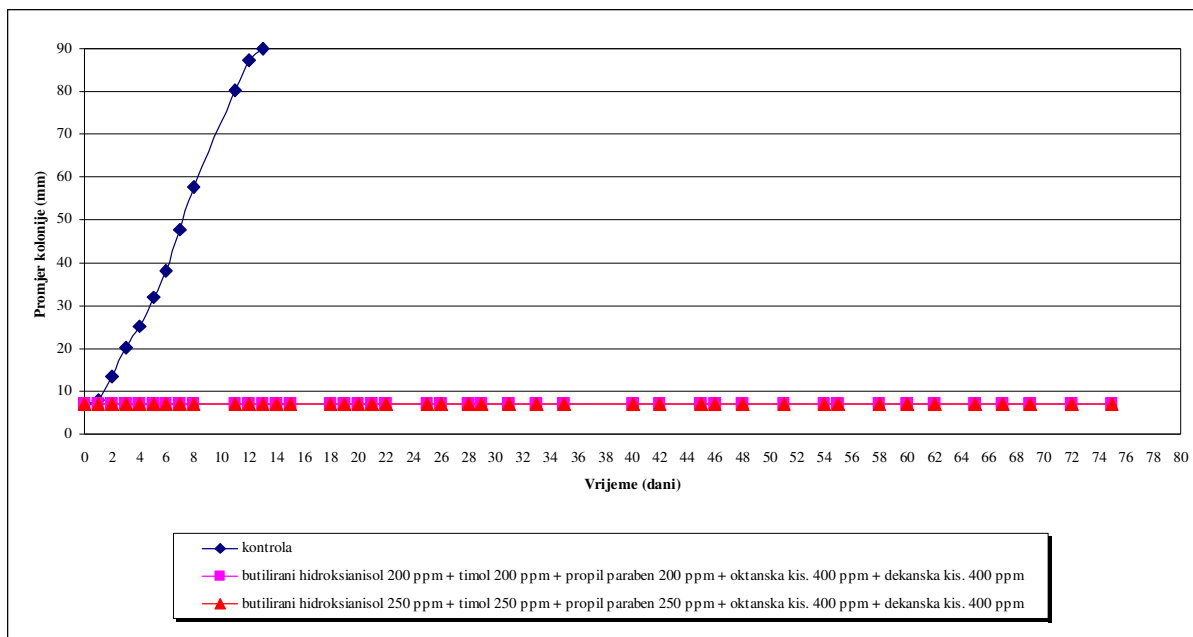
Slika 26: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 21: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	13,5
kombinacija 17 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+1000+1000	3	2,9
kombinacija 18 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis.	250+250+250+1000+1000	4	3,0
kombinacija 19 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	300+300+300+1000+1000	5	3,0

### 4.3. Rast *Fusarium graminearuma* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,95

Kombinacije antifungalnih tvari koje su bile učinkovite na krmnoj smjesi PPT-2 korištene su i u pokusu s krmnom smjesom SK-D-N.

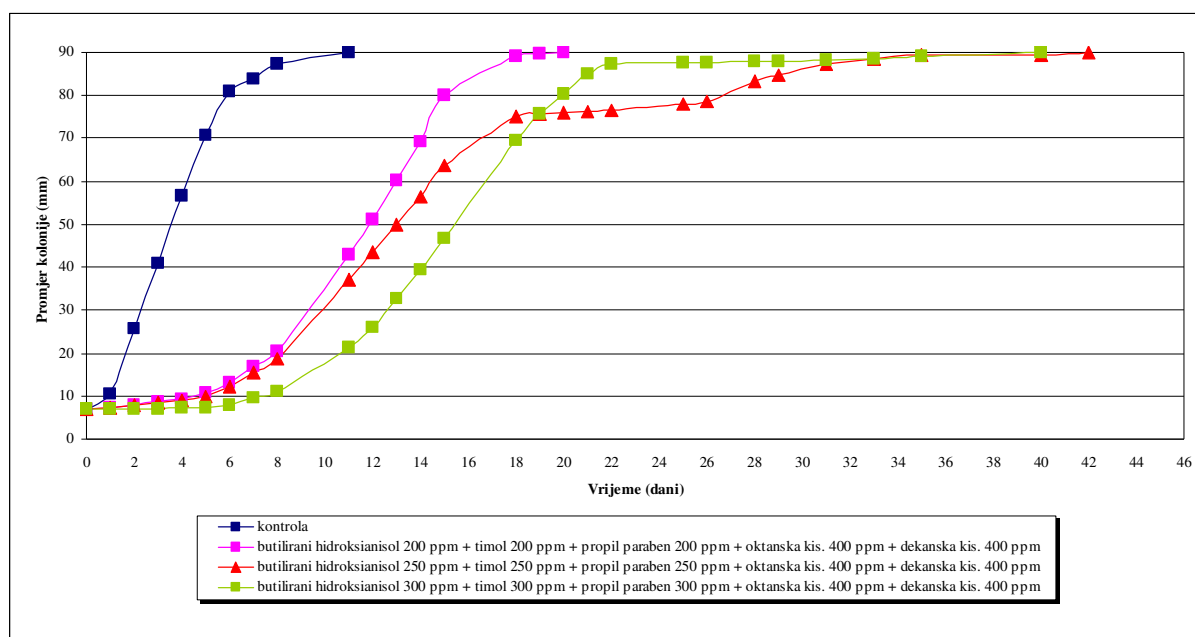


Slika 27: Dnevni rast *Fusarium graminearuma* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 22: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearuma* na krmivu SK-D-N pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	7,0
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+400+400	75	0,0
kombinacija 2 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis .	250+250+250+400+400	75	0,0

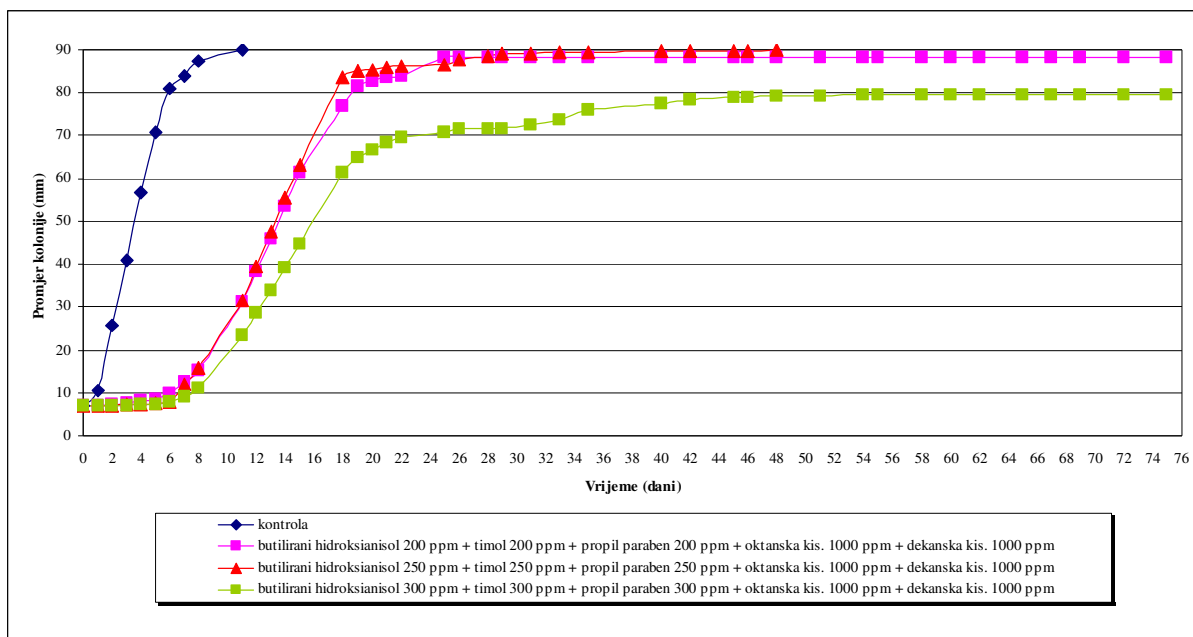
#### 4.4. Rast *Fusarium graminearum* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98



Slika 28: Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 23: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu SK-D-N pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	8,9
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+400+400	4	5,0
kombinacija 2 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+400+400	5	2,5
kombinacija 3 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	300+300+300+400+400	7	2,9



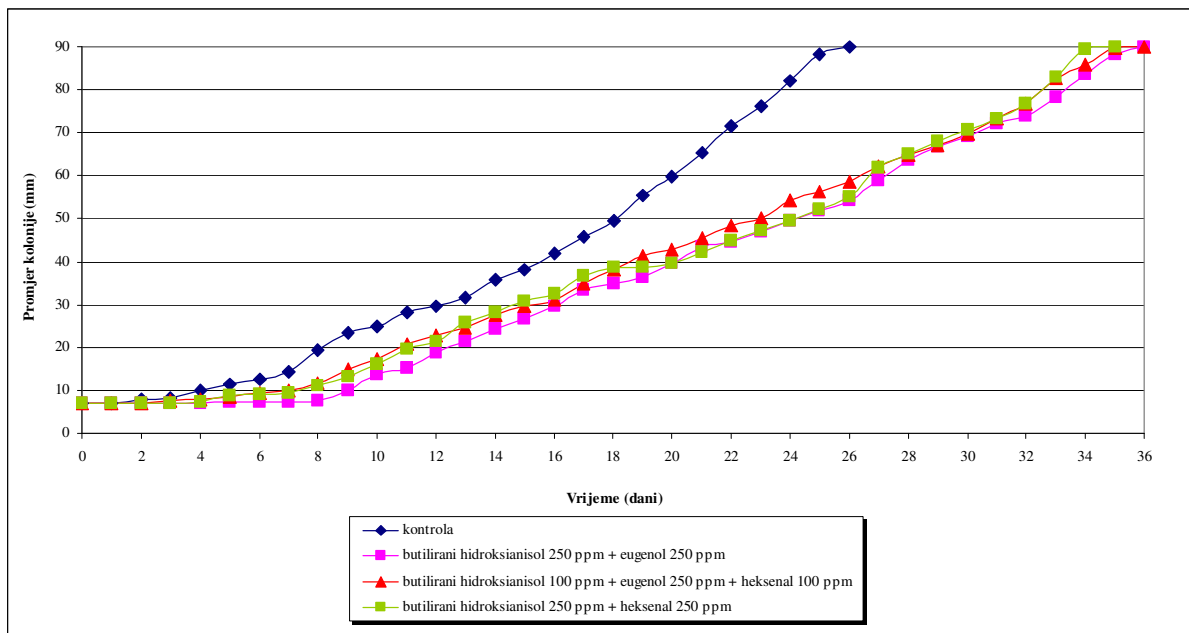
Slika 29: Dnevni rast *Fusarium graminearuma* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 24: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearuma* na krmivu SK-D-N pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	8,9
kombinacija 4 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis.	200+200+200+1000+1000	5	3,8 <sup>a</sup>
kombinacija 5 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+1000+1000	6	2,1
kombinacija 6 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	300+300+300+1000+1000	7	1,5 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 88 mm; <sup>b</sup> stagnacija rasta nakon 79 mm

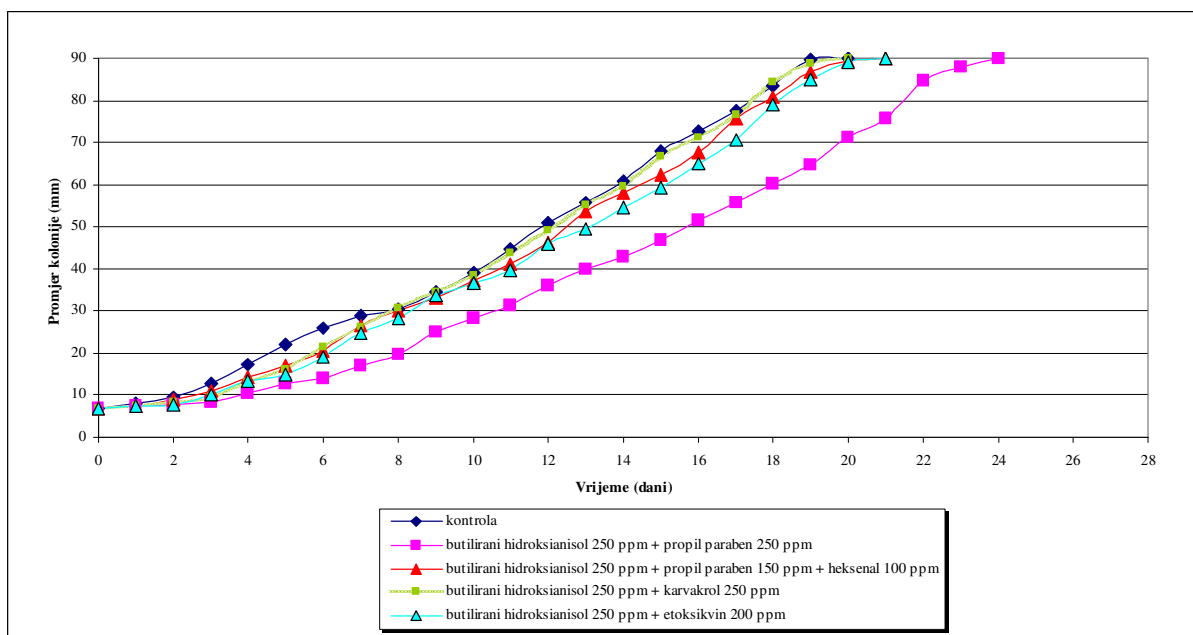
#### 4.5. Rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,95



Slika 30: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 25: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

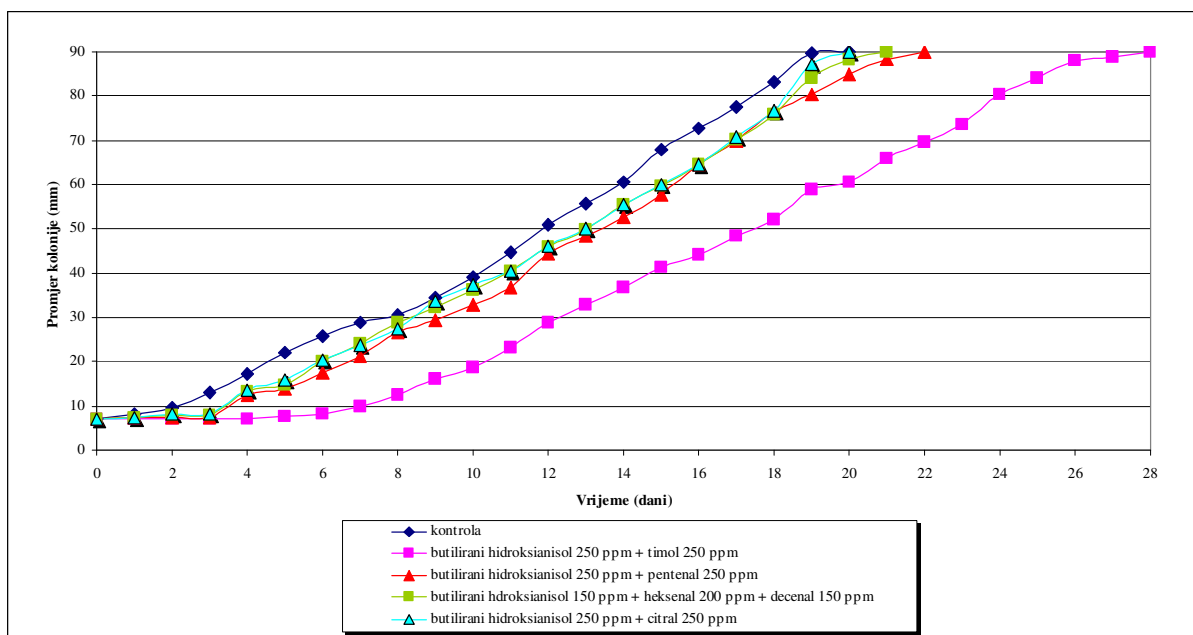
kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		4	3,3
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + eugenol	250+250	9	2,5
kombinacija 2 butilirani hidroksianisol + eugenol + heksenal	100+250+100	7	2,5
kombinacija 3 butilirani hidroksianisol + heksenal	250+250	7	2,5



Slika 31: Dnevni rast *Fusarium verticillioidesa* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 26: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioidesa* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

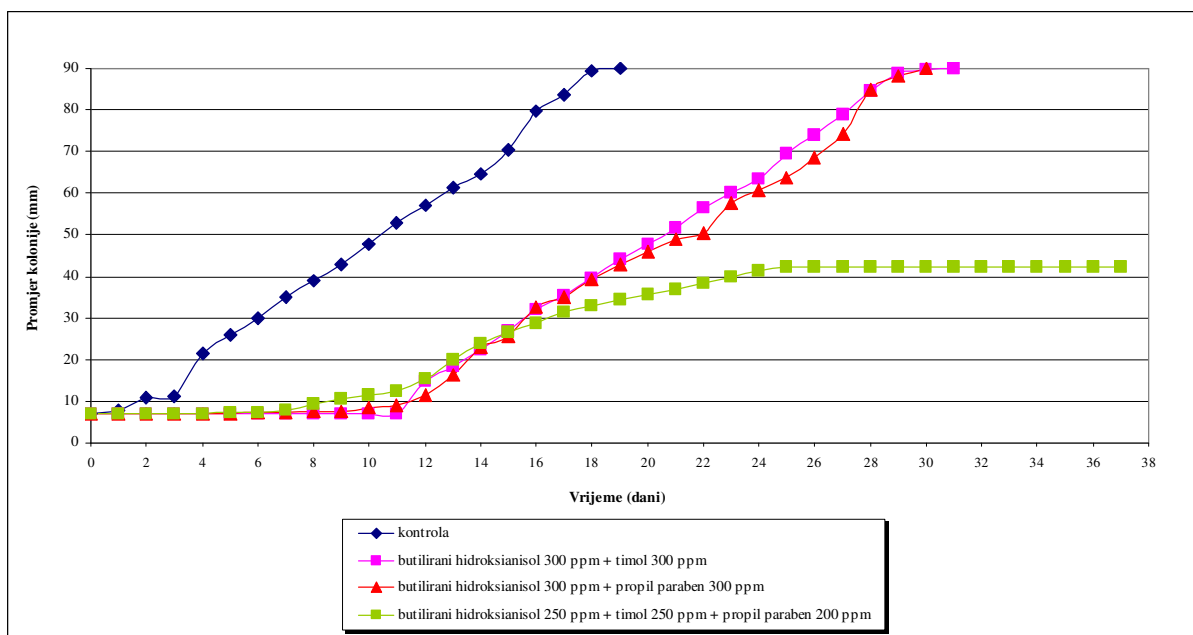
kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		2	4,5
kombinacija 4 butilirani hidroksianisol + propil paraben	250+250	4	3,7
kombinacija 5 butilirani hidroksianisol + propil paraben + heksenal	250+150+100	2	4,4
kombinacija 6 butilirani hidroksianisol + karvakrol	250+250	3	4,6
kombinacija 7 butilirani hidroksianisol + etoksikvin	250+200	3	4,3



Slika 32: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 27: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		2	4,5
kombinacija 8 butilirani hidroksianisol + timol	250+250	7	3,5
kombinacija 9 butilirani hidroksianisol + pentenal	250+250	3	4,2
kombinacija 10 butilirani hidroksianisol + heksenal + decenal	150+200+150	3	4,3
kombinacija 11 butilirani hidroksianisol + citral	250+250	3	4,3



Slika 33: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri  $a_w$  0,95 i 25°C

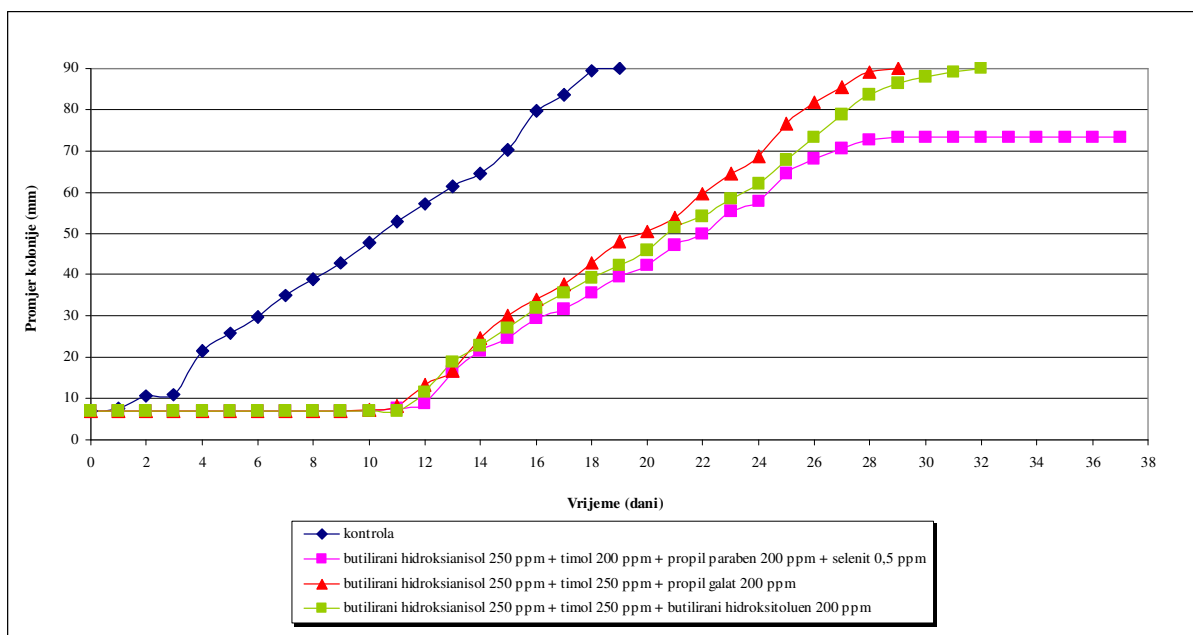
Tablica 28: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri  $a_w$  0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		2	4,7
kombinacija 12 butilirani hidroksianisol + timol	300+300	11	3,1
kombinacija 13 butilirani hidroksianisol + propil paraben	300+300	11	3,0
kombinacija 14 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	250+250+200	9	1,6** <sup>a</sup>

\*\* stopa rasta značajno niža od kontrole,  $p < 0,01$

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 42 mm



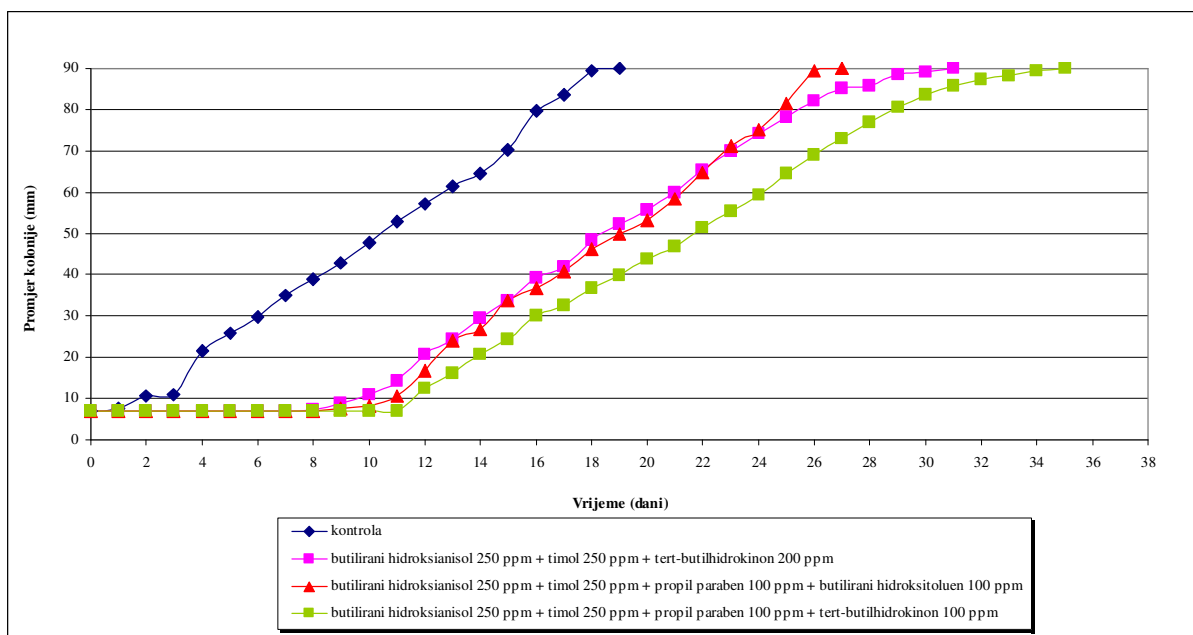


Slika 34: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 29: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		3	4,7
kombinacija 15 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + selenit	250+200+200+0,5	12	2,7 <sup>a</sup>
kombinacija 16 butilirani hidroksianisol + timol + propil galat	250+250+200	11	3,2
kombinacija 17 butilirani hidroksianisol + timol + butilirani hidroksitoluen	250+250+200	11	3,1

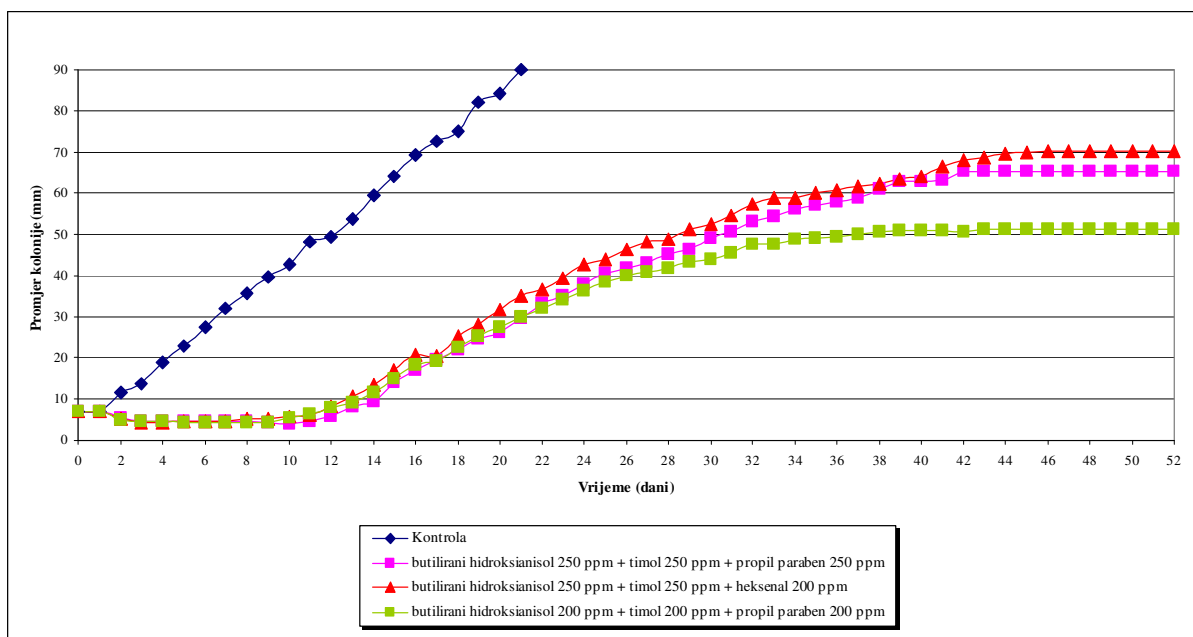
<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 73 mm



Slika 35: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 30: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		3	4,7
kombinacija 18 butilirani hidroksianisol + timol + tert-butilhidrokinon	250+250+200	10	3,3
kombinacija 19 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + butilirani hidroksitoluen	250+250+100+100	11	3,4
kombinacija 20 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + tert-butilhidrokinon	250+250+100+100	11	2,9



Slika 36: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

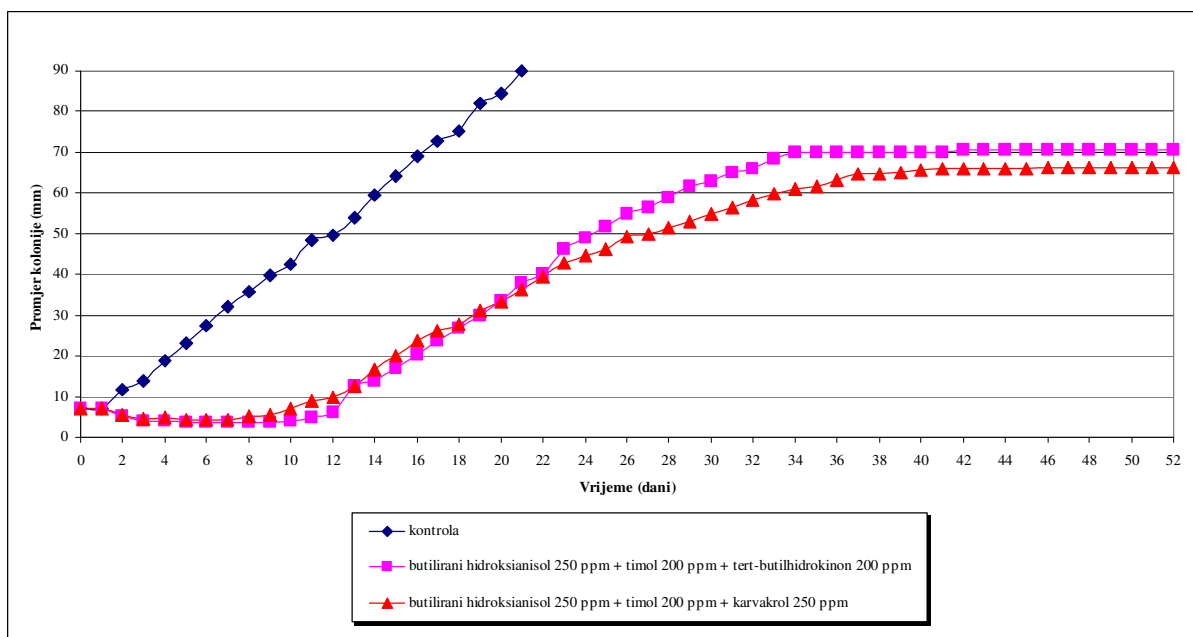
Tablica 31: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	4,1
kombinacija 21 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	250+250+250	14	1,7* <sup>a</sup>
kombinacija 22 butilirani hidroksianisol + timol + heksenal	250+250+200	13	1,7 <sup>b</sup>
kombinacija 23 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200	13	1,4** <sup>c</sup>

\* stopa rasta značajno niža od kontrole, p<0,05

\*\* stopa rasta značajno niža od kontrole, p<0,01

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 65 mm; <sup>b</sup> stagnacija rasta nakon 70 mm; <sup>c</sup> stagnacija rasta nakon 51 mm

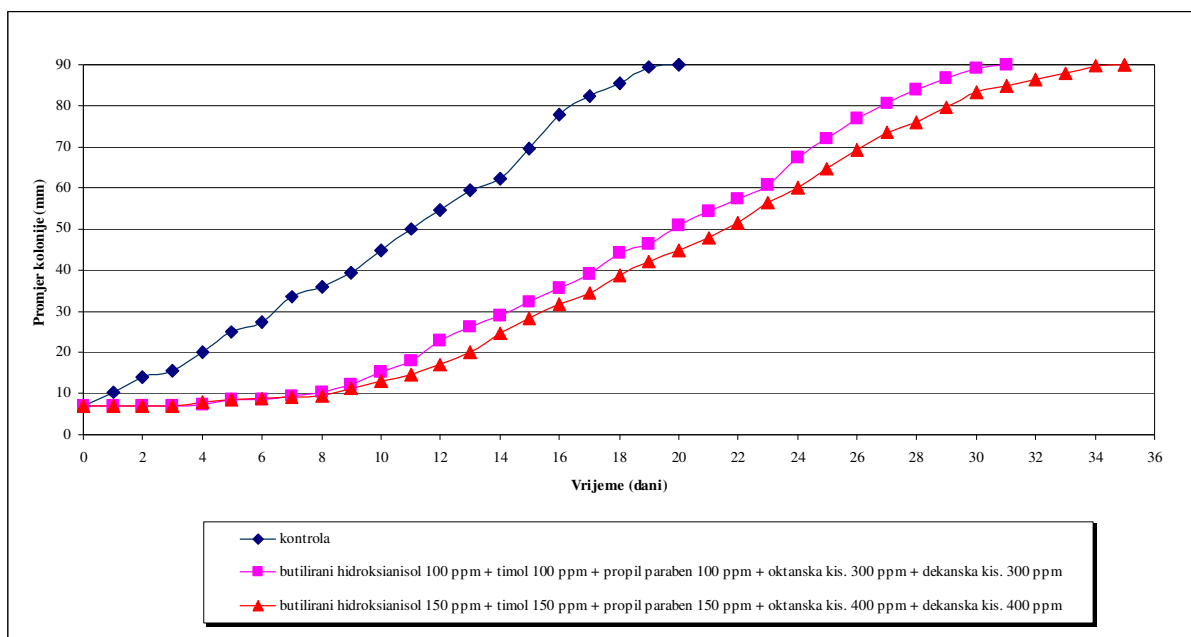


Slika 37: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 32: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	4,1
kombinacija 24 butilirani hidroksianisol + timol + tert-butilhidrokinon	250+200+200	12	2,0 <sup>a</sup>
kombinacija 25 butilirani hidroksianisol + timol + karvakrol	250+200+250	12	1,7 <sup>b</sup>

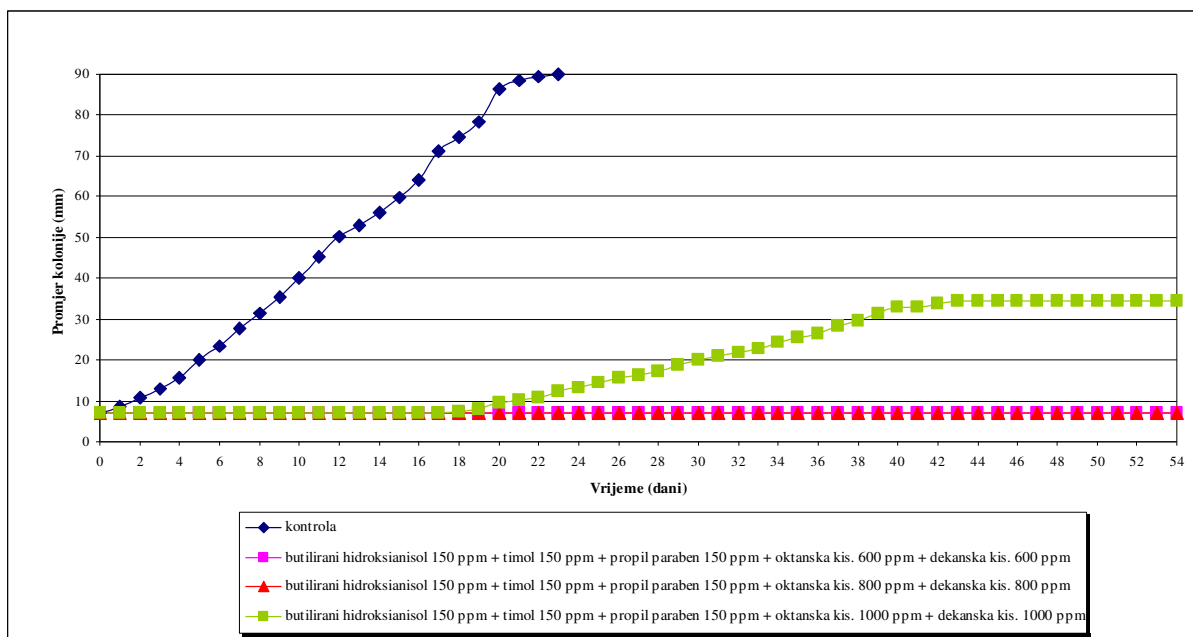
<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 70 mm; <sup>b</sup> stagnacija rasta nakon 66 mm



Slika 38: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 33: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	4,4
kombinacija 26 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	100+100+100+300+300	8	3,1
kombinacija 27 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis.	150+150+150+400+400	8	2,8

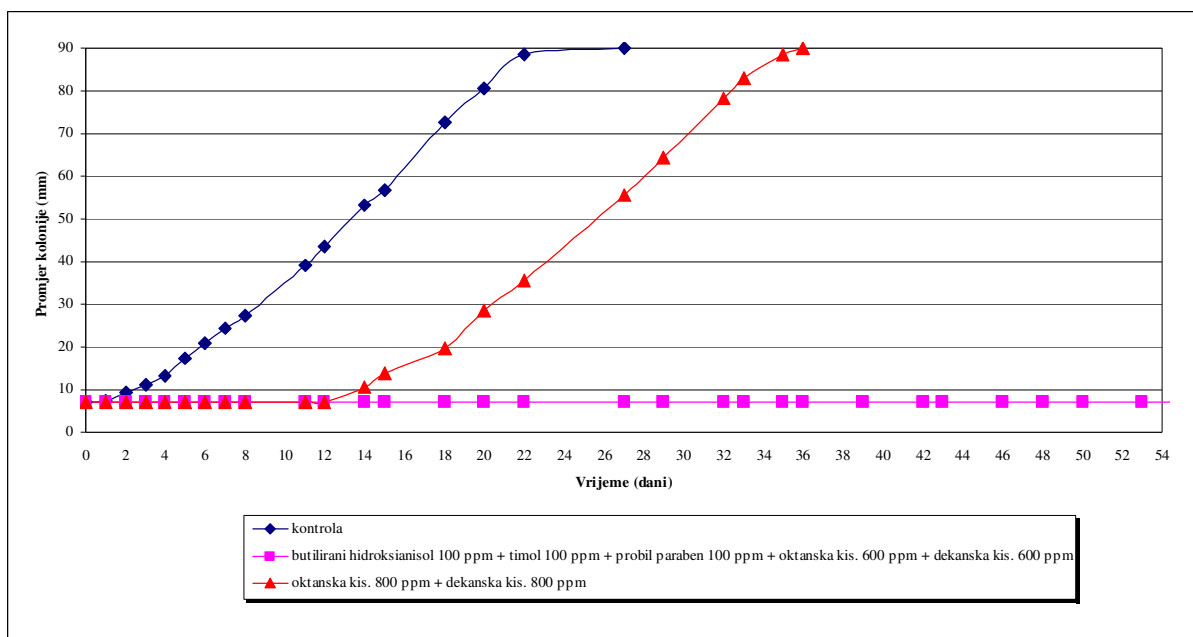


Slika 39: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 34: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		2	4,0
kombinacija 28 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+600+600	54	0,0
kombinacija 29 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+800+800	54	0,0
kombinacija 30 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+1000+1000	54	0,7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 35 mm

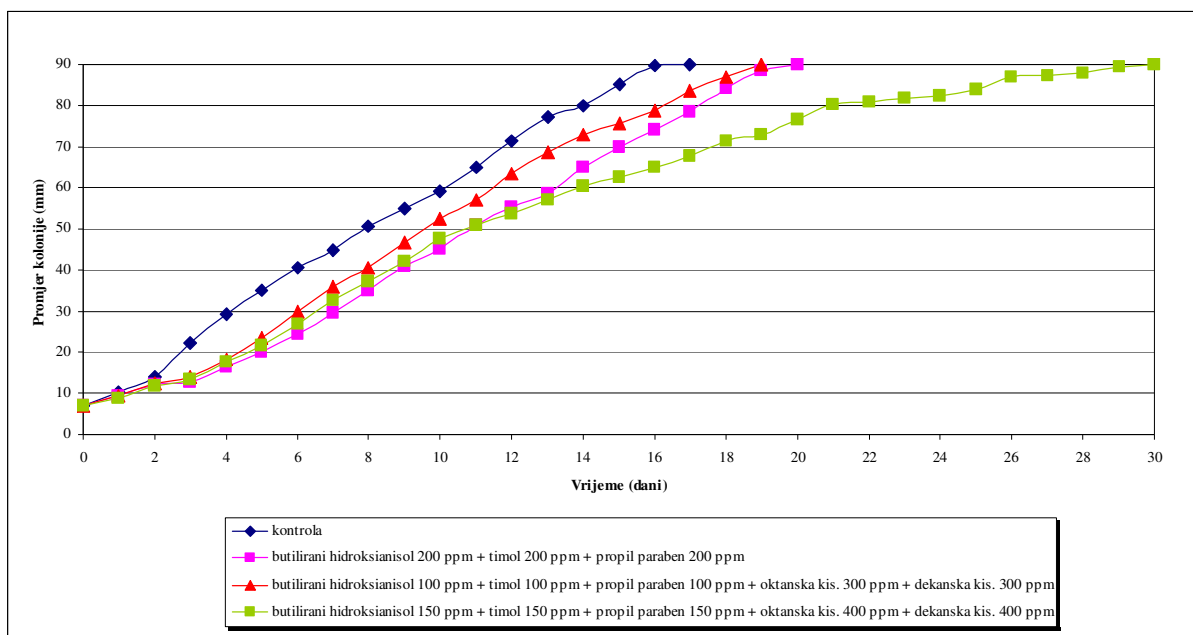


Slika 40: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 35: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		2	3,6
kombinacija 31 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	100+100+100+600+600	63	0,0
kombinacija 32 oktanska kis. + dekanska kis.	800+800	12	2,4

#### 4.6. Rast *Fusarium verticillioidesa* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98

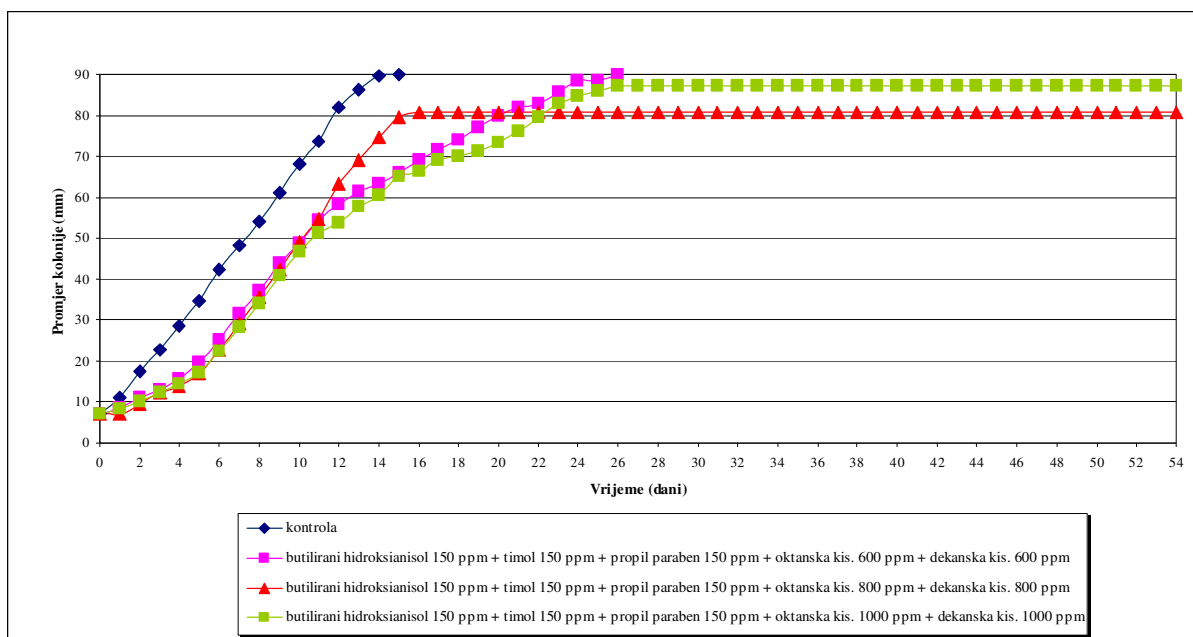


Slika 41: Dnevni rast *Fusarium verticillioidesa* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 36: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioidesa* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	5,2
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200	1	4,5
kombinacija 2 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	100+100+100+300+300	1	4,8
kombinacija 3 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+400+400	1	3,0



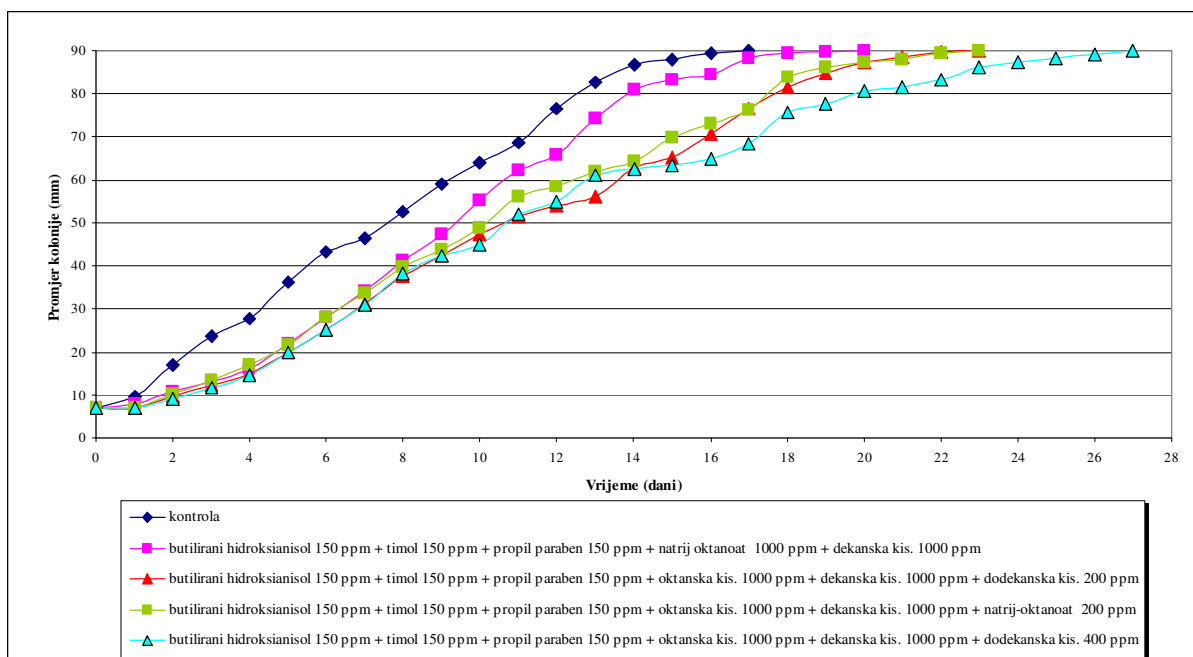


Slika 42: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 37: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	5,2
kombinacija 4 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+600+600	3	3,5
kombinacija 5 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis	150+150+150+800+800	4	5,0 <sup>a</sup>
kombinacija 6 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis	150+150+150+1000+1000	2	3,2 <sup>b</sup>

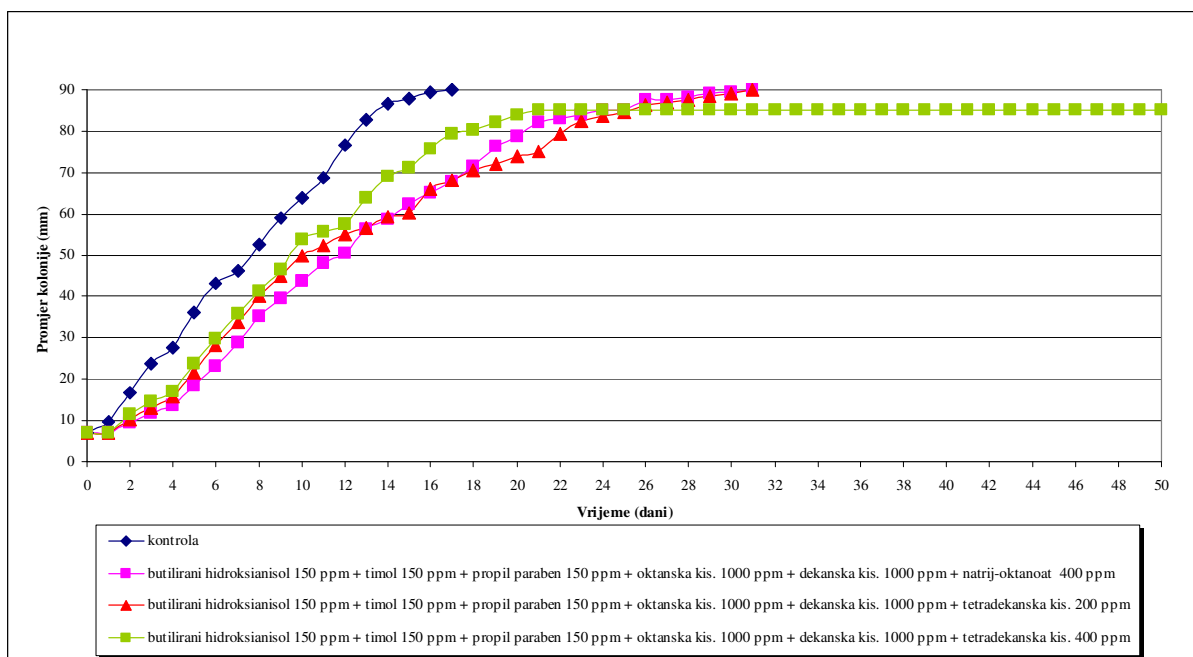
<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 81 mm; <sup>b</sup> stagnacija rasta nakon 87 mm



Slika 43: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 38: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		0	6,0
kombinacija 7 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + natrij oktanoat + dekanska kis.	150+150+150+1000+1000	2	5,0
kombinacija 8 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis. + dodekanska kis.	150+150+150+1000+1000+200	2	4,1
kombinacija 9 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis. + natrij oktanoat	150+150+150+1000+1000+200	2	4,1
kombinacija 10 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis. + dodekanska kis.	150+150+150+1000+1000+400	2	3,5

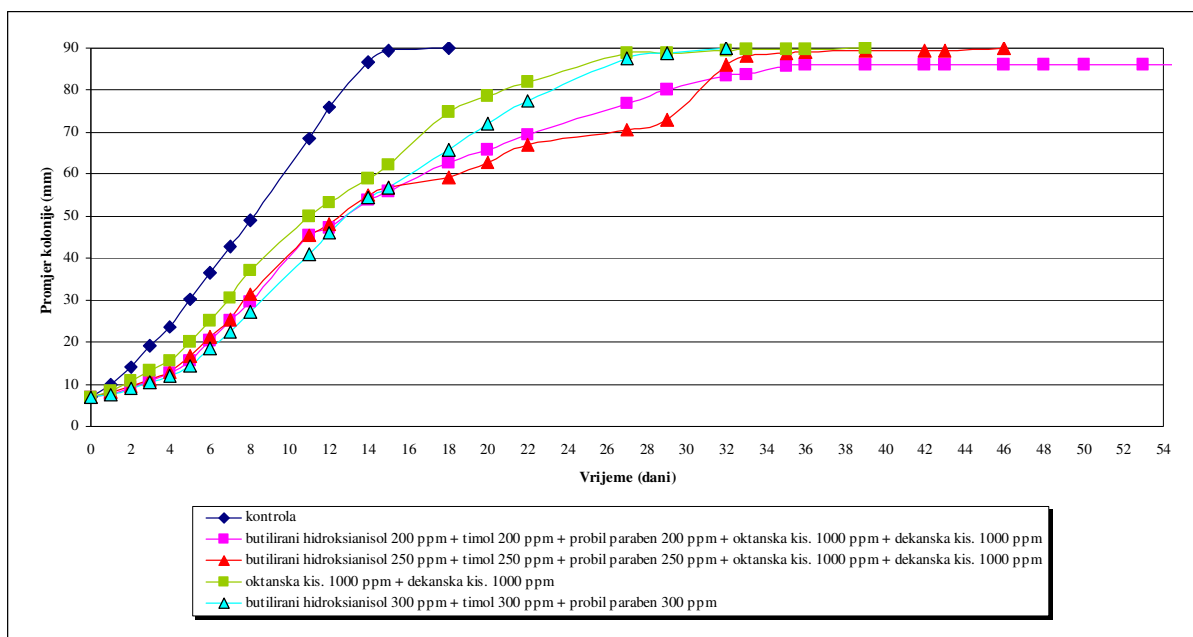


Slika 44: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri 0,98 i 25°C

Tablica 39: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	5,4
kombinacija 11 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis. + natrij oktanoat	150+150+150+1000+1000+400	2	3,0
kombinacija 12 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis. + tetradekanska kis.	150+150+150+1000+1000+200	2	2,9
kombinacija 13 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis.+ dekanska kis.+ tetradekanska kis.	150+150+150+1000+1000+400	1	3,9 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 85 mm



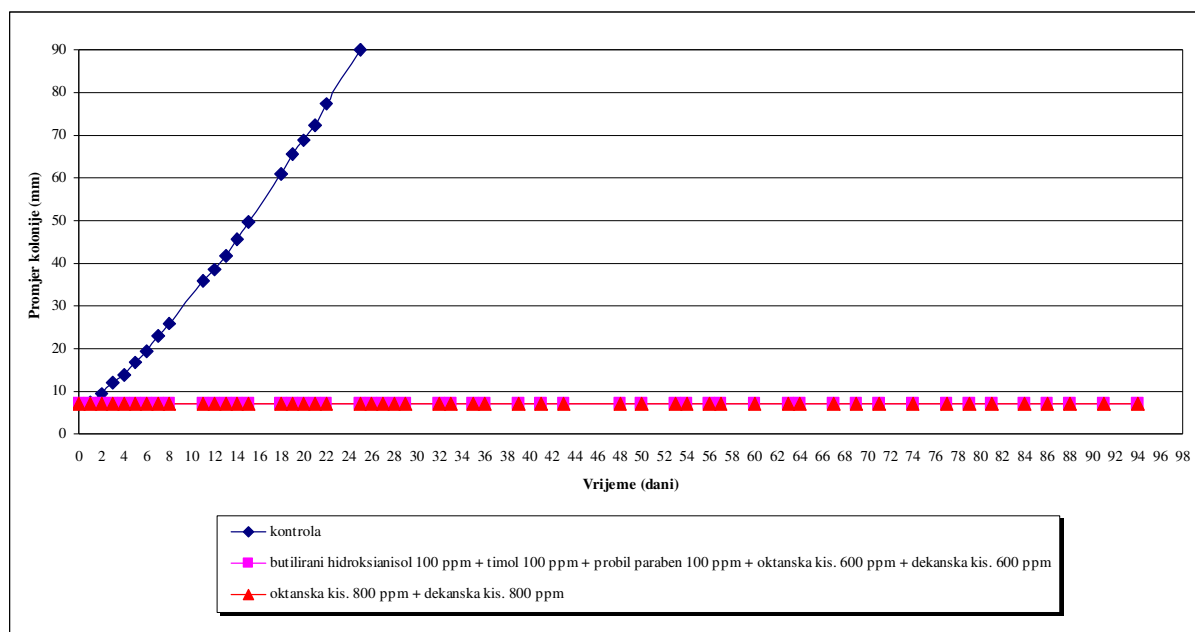
Slika 45: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 40: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	5,4
kombinacija 14 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis	200+200+200+1000+1000	2	2,1 <sup>a</sup>
kombinacija 15 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+1000+1000	2	2,0
kombinacija 16 oktanska kis. + dekanska kis.	1000+1000	1	2,4
kombinacija 17 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	300+300+300	3	3,1

<sup>a</sup> stagnacija rasta nakon 86 mm

#### 4.7. Rast *Fusarium verticillioides* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,95

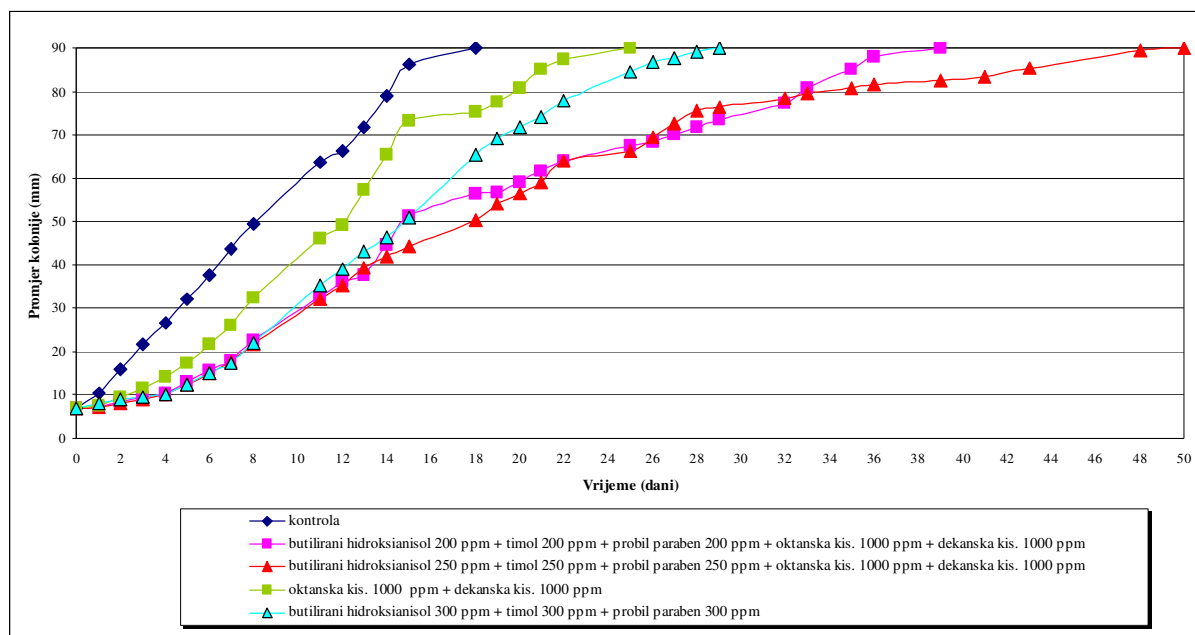


Slika 46: Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,95 i 25°C

Tablica 41: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides* na krmivu SK-D-N pri aw 0,95 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		2	3,4
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + timol+ propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	100+100+100+600+600	94	0,0
kombinacija 2 oktanska kis. + dekanska kis.	800+800	94	0,0

#### 4.8. Rast *Fusarium verticillioidesa* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98



Slika 47: Dnevni rast *Fusarium verticillioidesa* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 42: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioidesa* na krmivu SK-D-N pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm/dan)
kontrola		1	5,0
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + timol+ propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+1000+1000	3	2,4
kombinacija 2 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+1000+1000	3	1,9
kombinacija 3 oktanska kis. + dekanska kis.	1000+1000	2	3,9
kombinacija 4 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	300+300+300	3	3,3

#### 4.9. Odabrane kombinacije antifungalnih tvari za određivanje trihotecena tipa B u krmnim smjesama

Sadržaj trihotecena tipa B određen je u različitim kombinacijama i koncentracijama antioksidanasa i masnih kiselina u krmnim smjesama.

Tablica 43: Kombinacije antifungalnih tvari za određivanje trihotecena tipa B u krmnoj smjesi PPT-2

<b>kombinacije antifungalnih tvari</b>	<b>koncentracija (ppm)</b>
kombinacija 1 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	100+100+100
kombinacija 2 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	150+150+150
kombinacija 3 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200
kombinacija 4 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+400+400
kombinacija 5 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+400+400
kombinacija 6 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+400+400
kombinacija 1 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	100+100+100
kombinacija 2 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	150+150+150
kombinacija 3 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200
kombinacija 4 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+400+400
kombinacija 5 aw 0,98	150+150+150+600+600

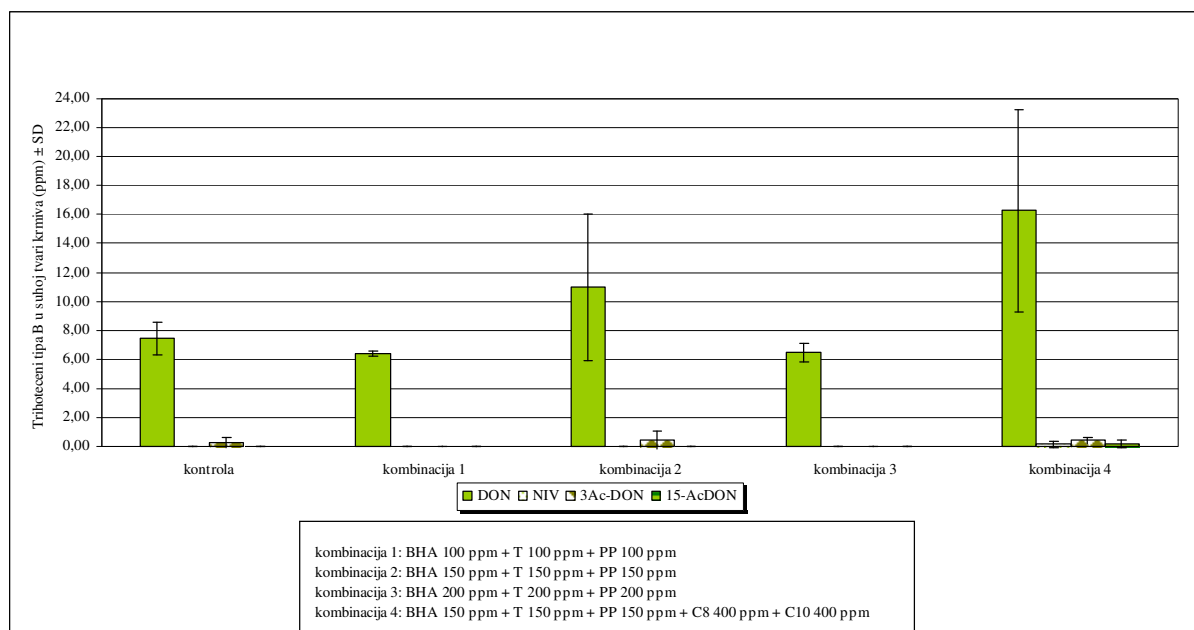
butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	
kombinacija 6 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+800+800
kombinacija 7 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+1000+1000
kombinacija 8 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+400+400
kombinacija 9 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+400+400
kombinacija 10 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	300+300+300+400+400
kombinacija 11 aw 0,98 butilirani hidroksianisol +timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+1000+1000
kombinacija 12 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis	250+250+250+1000+1000
kombinacija 13 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	300+300+300+1000+1000



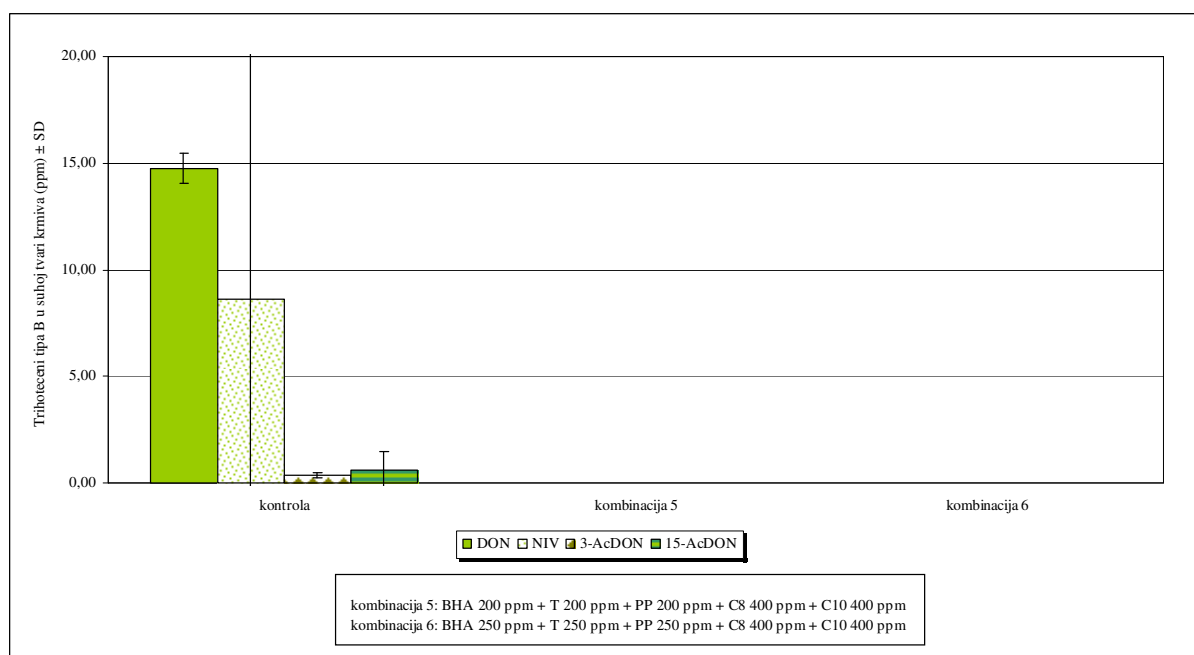
Tablica 44: Kombinacije antifungalnih tvari za određivanje trihotecena tipa B u krmnoj smjesi SK-D-N

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)
kombinacija 1 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+400+400
kombinacija 2 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+400+400
kombinacija 1 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+400+400
kombinacija 2 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+400+400
kombinacija 3 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	300+300+300+400+400
kombinacija 4 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+1000+1000
kombinacija 5 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+1000+1000
kombinacija 6 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	300+300+300+1000+1000

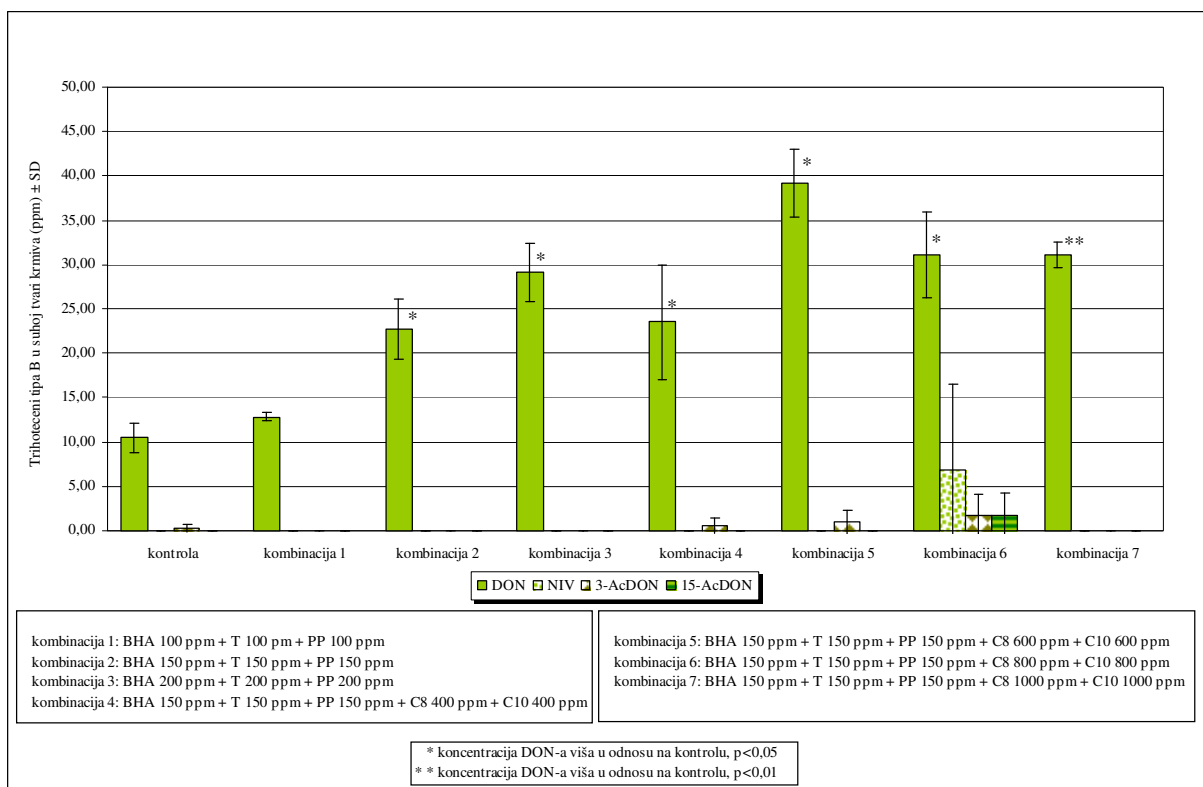
### 4.9.1. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi PPT-2



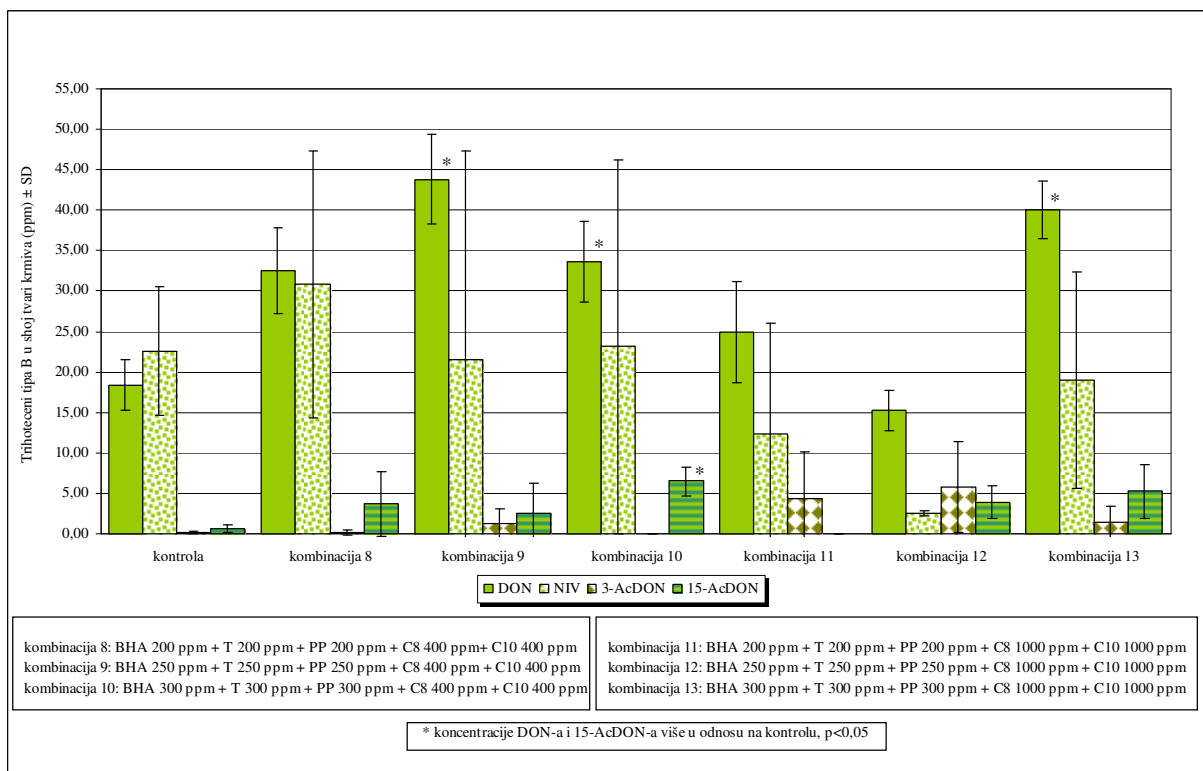
Slika 48: Koncentracije trihotecena tipa B u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari pri  $a_w$  0,95



Slika 49: Koncentracije trihotecena tipa B u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari pri  $a_w$  0,95

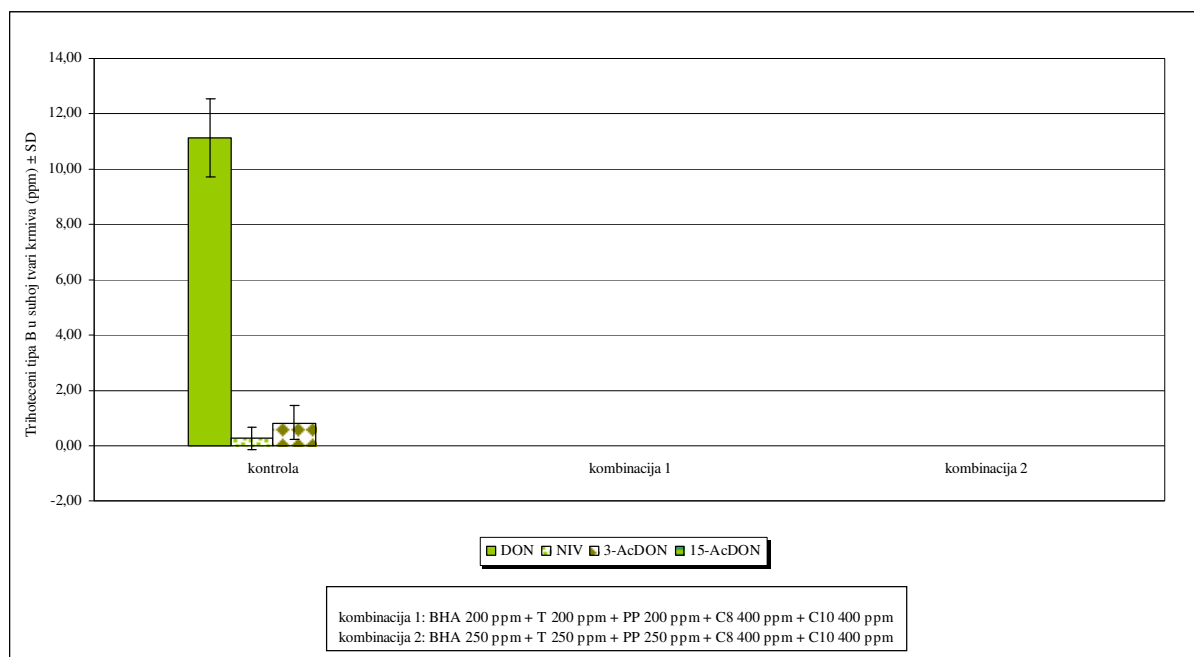


Slika 50: Koncentracije trihotecena tipa B u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari pri  $a_w$  0,98

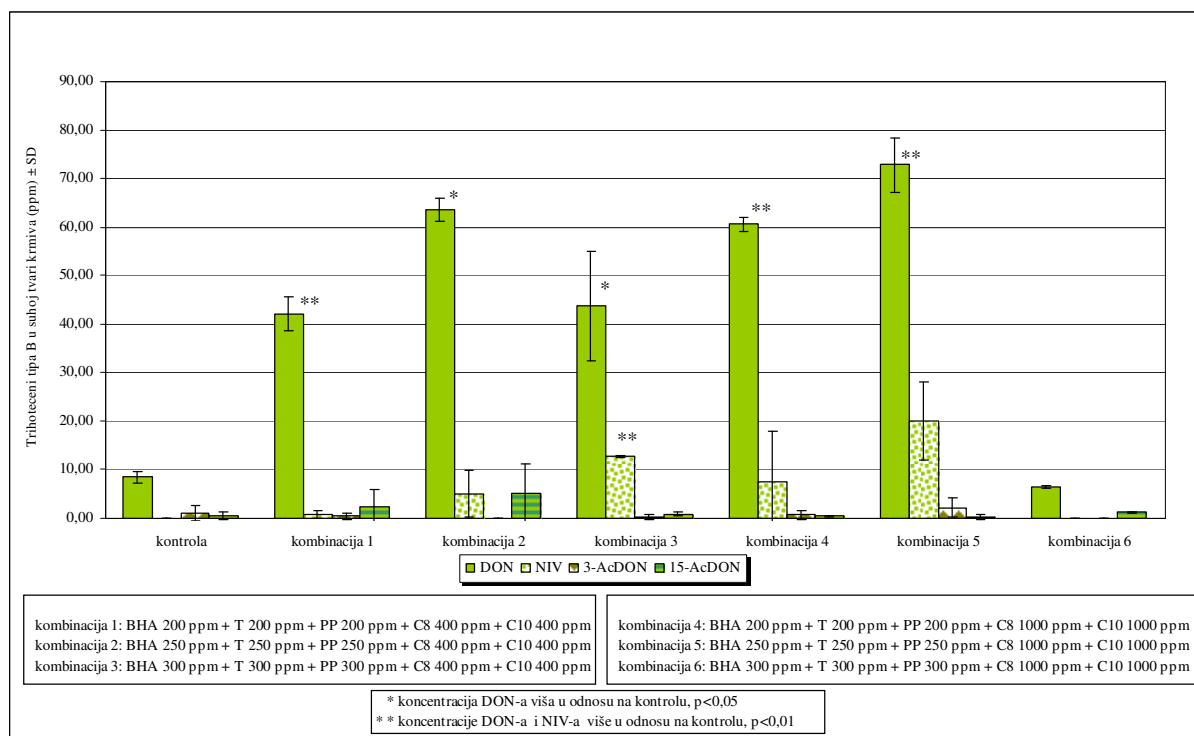


Slika 51: Koncentracije trihotecena tipa B u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari pri  $a_w$  0,98

## 4.9.2. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi SK-D-N



Slika 52: Koncentracije trihotecena tipa B u suhoj tvari krmiva SK-D-N uz odabrane kombinacije tvari pri  $a_w$  0,95



Slika 53: Koncentracije trihotecena tipa B u suhoj tvari krmiva SK-D-N uz odabrane kombinacije tvari pri  $a_w$  0,98

#### 4.10. Odabrane kombinacije antifungalnih tvari za određivanje FB1 i FB2 u krmnim smjesama

Sadržaj FB1 i FB2 određen je u različitim kombinacijama i koncentracijama antioksidanasa i masnih kiselina u krmnim smjesama.

Tablica 45: Kombinacije antifungalnih tvari za određivanje FB1 i FB2 u krmnoj smjesi PPT-2

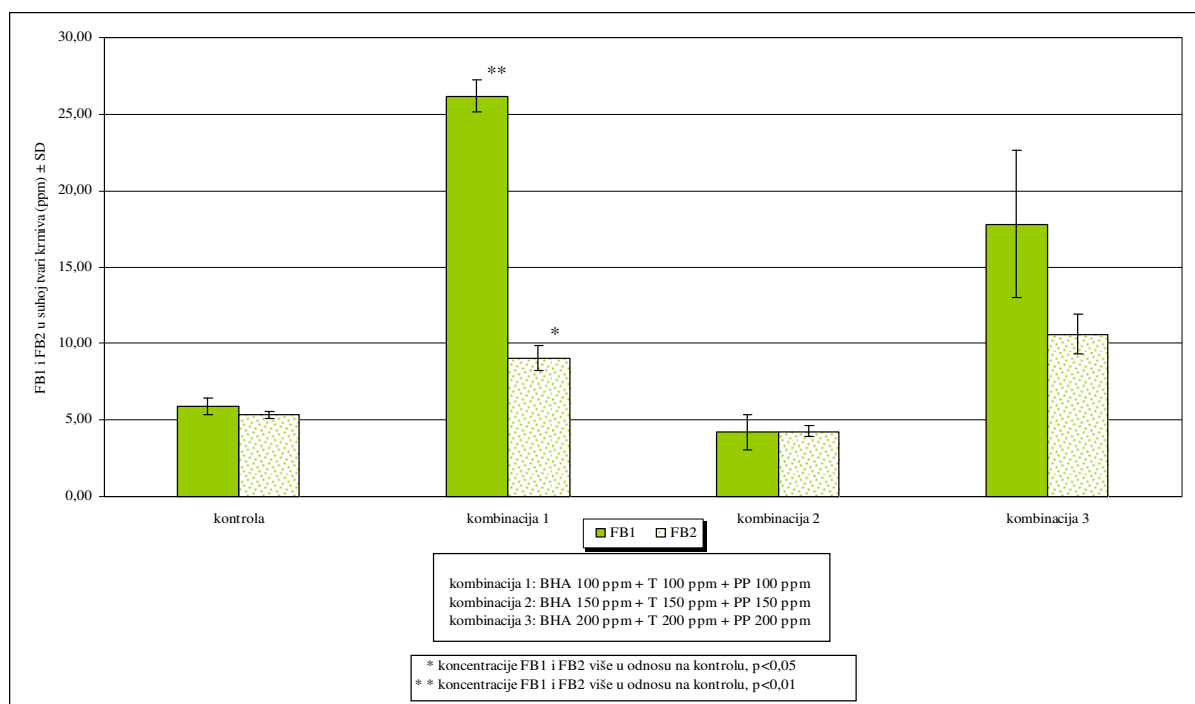
<b>kombinacije antifungalnih tvari</b>	<b>koncentracija (ppm)</b>
kombinacija 1 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	100+100+100
kombinacija 2 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	150+150+150
kombinacija 3 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200
kombinacija 4 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+400+400
kombinacija 5 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	100+100+100+600+600
kombinacija 6 aw 0,95 oktanska kis. + dekanska kis.	800+800
kombinacija 1 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	100+100+100
kombinacija 2 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	150+150+150
kombinacija 3 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200
kombinacija 4 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+400+400
kombinacija 5 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben +	150+150+150+600+600

oktanska kis. + dekanska kis.	
kombinacija 6 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+800+800
kombinacija 7 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+1000+1000
kombinacija 8 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + tetradekanska kis.	150+150+150+200
kombinacija 9 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+1000+1000
kombinacija 10 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+1000+1000
kombinacija 11 aw 0,98 oktanska kis. + dekanska kis.	1000+1000
kombinacija 12 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	300+300+300

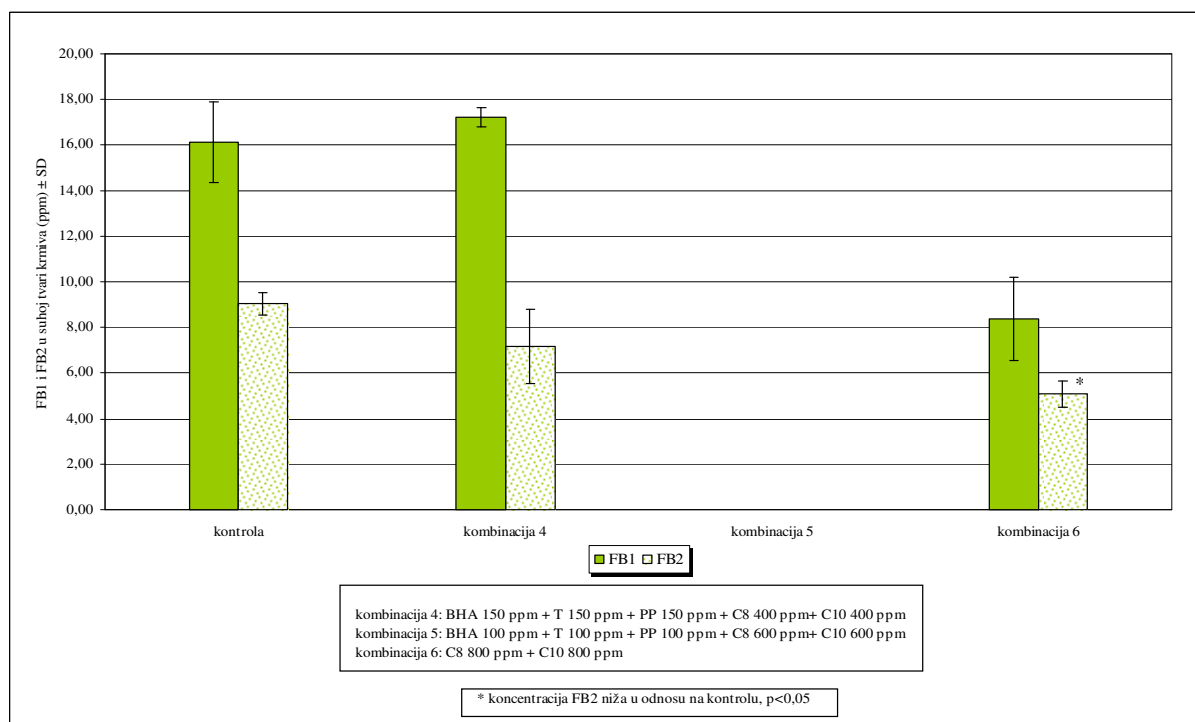
Tablica 46: Kombinacije antifungalnih tvari za određivanje FB1 i FB2 u krmnoj smjesi SK-D-N

<b>kombinacije antifungalnih tvari</b>	<b>koncentracija (ppm)</b>
kombinacija 1 aw 0,95 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis	100+100+100+600+600
kombinacija 2 aw 0,95 oktanska kis. + dekanska kis.	800+800
kombinacija 1 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis	200+200+200+1000+1000
kombinacija 2 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	250+250+250+1000+1000
kombinacija 3 aw 0,98 oktanska kis. + dekanska kis.	1000+1000
kombinacija 4 aw 0,98 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	300+300+300

#### 4.10.1. FB1 i FB2 u krmnoj smjesi PPT-2

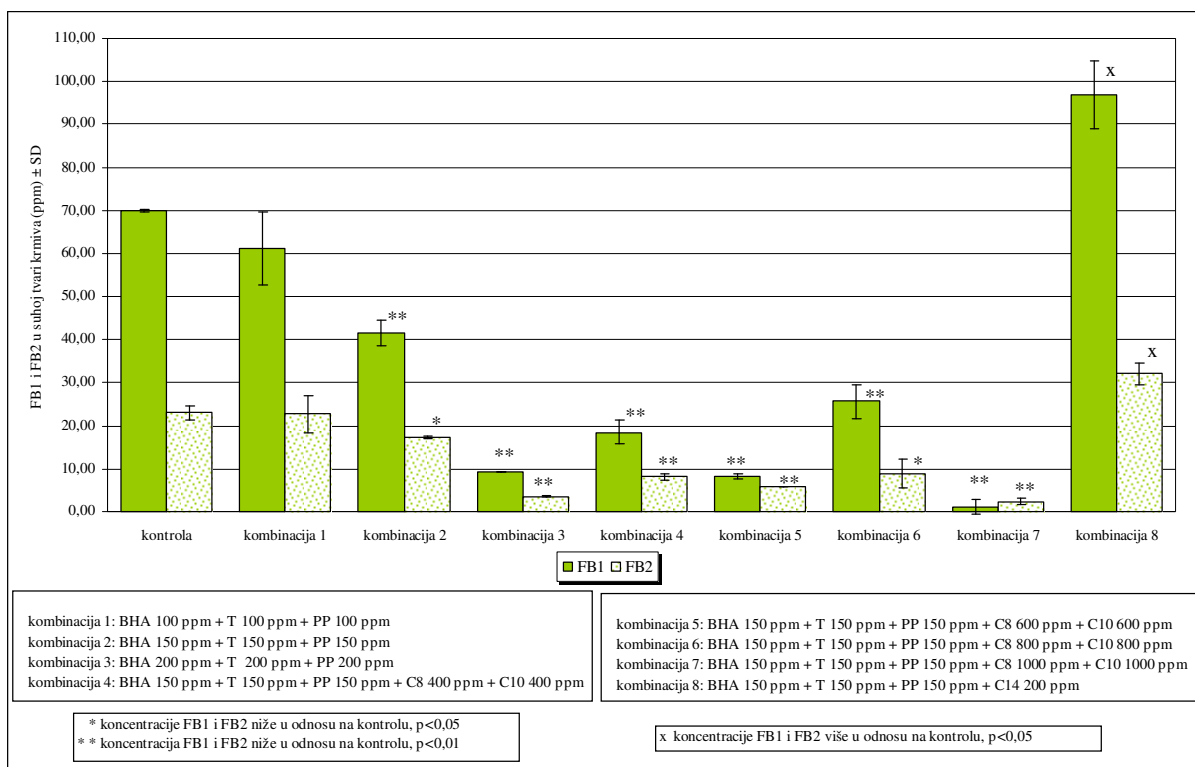


Slika 54: Koncentracije fumonizina B1 i B2 u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari kod aktiviteta vode 0,95

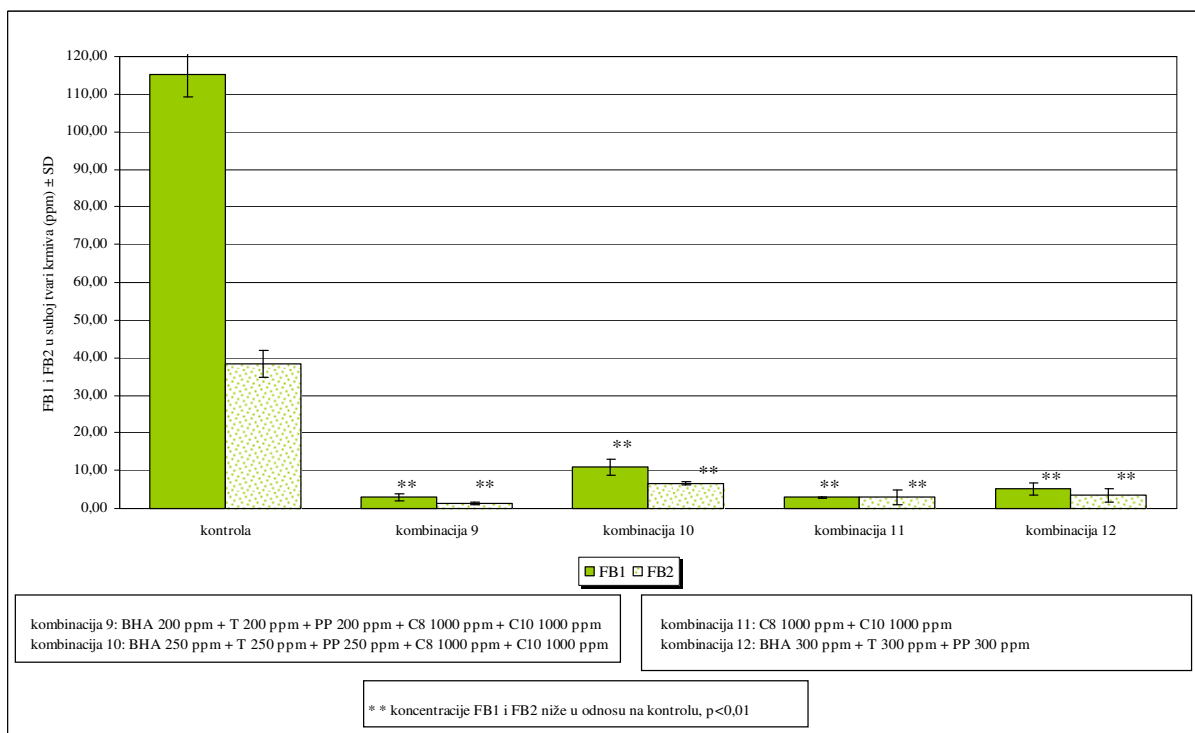


Slika 55: Koncentracije fumonizina B1 i B2 u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari kod aktiviteta vode 0,95



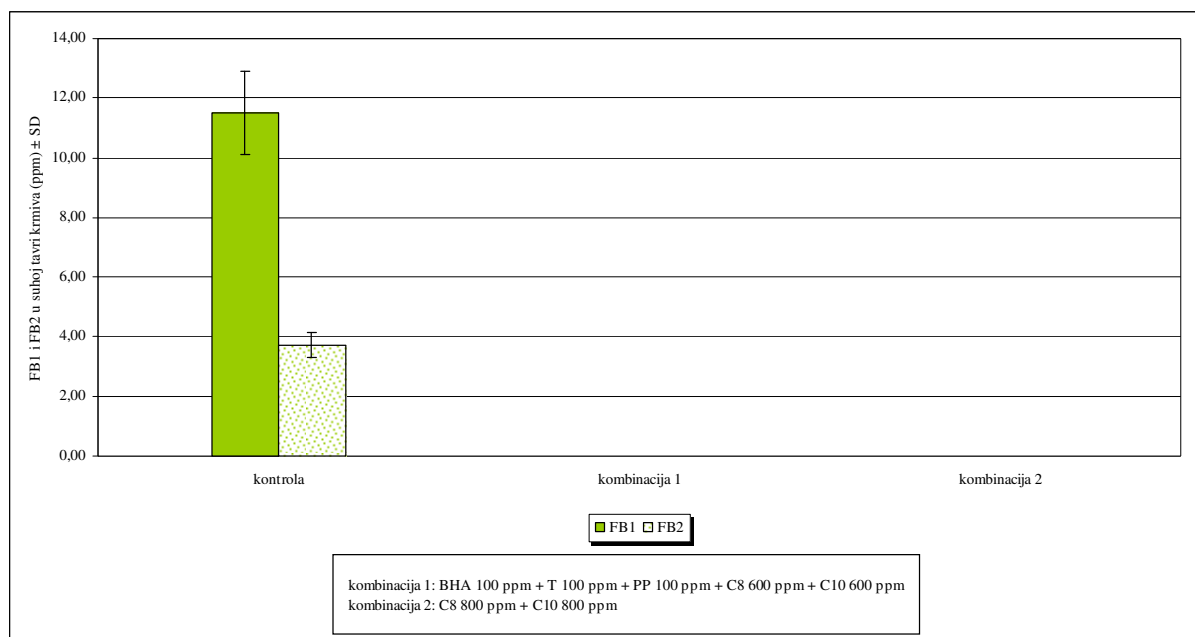


Slika 56: Koncentracije fumonizina B1 i B2 u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari kod aktiviteta vode 0,98

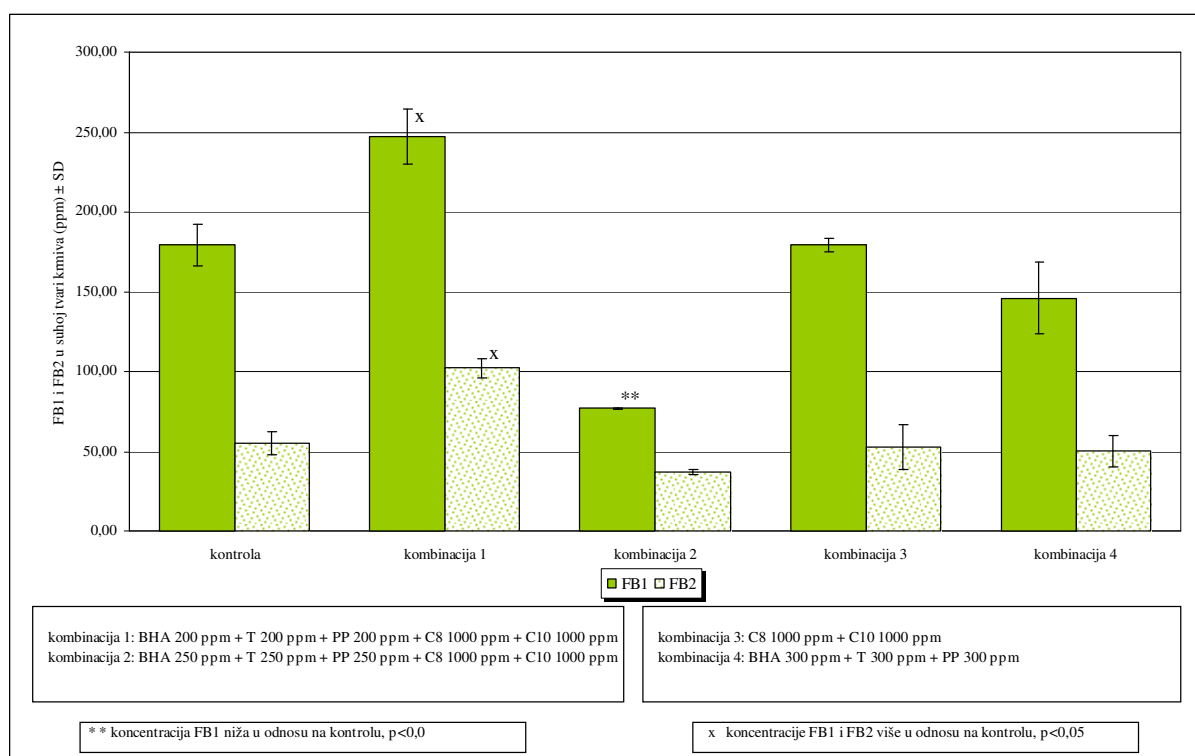


Slika 57: Koncentracije fumonizina B1 i B2 u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari kod aktiviteta vode 0,98

#### 4.10.2. FB1 i FB2 u krmnoj smjesi SK-D-N



Slika 58: Koncentracije fumonizina B1 i B2 u suhoj tvari krmiva SK-D-N uz odabrane kombinacije tvari kod aktiviteta vode 0,95



Slika 59: Koncentracije fumonizina B1 i B2 u suhoj tvari krmiva SK-D-N uz odabrane kombinacije tvari kod aktiviteta vode 0,98

## **5. RASPRAVA**

Stočna hrana bez prisustva gljiva i njihovih otrovnih sekundarnih metabolita zadržava hranjivu vrijednost, a samim tim je poboljšana produktivnost stoke smanjenjem gubitaka uslijed trovanja mikotoksinima. Osim toga, povećana je sigurnost, hranjiva vrijednost, kakvoća i održivost proizvoda životinjskog podrijetla u ljudskoj prehrani. Kvalitetna stočna hrana bez prisustva kontaminanata je cilj svakog proizvođača stočne hrane. Ovim istraživanjem se pokušava utvrditi učinkovita kombinacija antioksidanasa, sastojaka eteričnih ulja i masnih kiselina koja će djelovati suprimirajuće na rast plijesni i biosintezu mikotoksina.

## **5.1. Učinkovitost kombinacija i koncentracija antifungalnih tvari na rast**

### ***Fusarium graminearum***

Prve ispitane smjese tvari na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 prikazane su u Tablici 5. Sve ispitane kombinacije imale su produženu lag fazu od 4-5 dana u odnosu na kontrolu (Slika 10). Kombinacije i koncentracije ispitanih tvari nisu bile dovoljno učinkovite u inhibiciji rasta *F. graminearum*. Lag faza (faza suzdržanog rasta) je razdoblje u kojemu se stanica priprema na rast u okolišu u kojem se nalazi te sintetizira RNA, enzime i druge molekule. Tijekom ovog razdoblja ne povećava se broj stanica i one su izrazito propusne prema tvarima iz okoliša te osjetljive na toksične agense. Uočeno produženje lag faze nastaje najvjerojatnije zbog poremećaja koje primijenjene antifungalne tvari izazivaju. Prvenstveno bi mogao biti značajan oksidativni stres koji bi za posljedicu imao pojačanu sintezu antioksidantnih enzima u stanicama. Ispitane smjese tvari nisu učinkovite najvjerojatnije zbog nedovoljne primijenjene koncentracije koja su iznosile 450 do 500 ppm ukupne koncentracije. Velluti i sur. (2004a) su utvrdili inhibiciju radijalnog rasta *F. proliferatuma* pri 1000 ppm ulja klinčića na sterilnom zrnu kukuruza. Eterično ulje klinčića se najvećim dijelom sastoji od eugenola koji je ispitan u kombinaciji 1. Limunska trava (cital) pri 1000 ppm, u istom istraživanju, ne pokazuje značajniju inhibiciju rasta *F. proliferatuma*. Heksenal, ispitan u kombinaciji 1 i 2 je strukturalno sličan citalu, pa je vjerojatno da ispitane koncentracije nisu dostatne u učinkovitoj inhibiciji rasta plijesni.

Tablice 6 i 7 prikazuju ispitane smjese koje su uz BHA obuhvatile i druge sintetske i prirodne antioksidanse. Sve kombinacije imaju određeno inhibitorno djelovanje u odnosu na kontrolu (Slike 11 i 12), ali je redukcija rasta i dalje nedovoljno učinkovita. Temeljem preliminarnih ispitivanja BHA je odabran kao stalni sastojak antifungalnih kombinacija zbog inhibitornog učinka na rast *Fusarium* sp. koji su primijetili i drugi istraživači. Thompson (1992) je zabilježio inhibiciju rasta *F. graminearum* na umjetnoj hranjivoj podlozi pri 250

ppm BHA. Kontrola micelijskog rasta *Fusariuma* sp. pri aw 0,95 ustanovljena je s 500 ppm BHA, na sterilnom zrnu kukuruza (Torres AM i sur., 2003), a značajna inhibicija rasta *Fusariuma*, *Aspergillus* i *Penicilliuma* zabilježena je tretmanom s 1000 ppm BHA pri aw 0,95 na nesteriliziranom zrnu kukuruza (Farnochi i sur., 2005). Ovdje su se najboljim pokazale kombinacije BHA s PP i BHA s T, koje najvjerojatnije imaju antifungalni sinergistički učinak. Očekivano, veća učinkovitost ovih tvari u kombinaciji primijećena je kod viših koncentracija. Torres AM i sur. (2003) su s 500 ppm PP reducirali micelijski rast *Fusariuma*, dok T u potpunosti sprječava rast *F. verticillioidea* pri istoj koncentraciji, ali na umjetnoj hranjivoj podlozi (Dambolena i sur., 2008). Daljnje ispitane antifungalne tvari uključivale su kombinaciju ova tri sastojka: BHA, T i PP. Istraživanja o sigurnosti upotrebe sintetskih antioksidanasa poput BHA i BHT pokazala su da njihova primjena u dopuštenim koncentracijama ne predstavlja opasnost za zdravlje, štoviše, ove tvari u koncentracijama od 100 ppm pokazuju antikancerogene osobine (Williams i sur., 1999).

Smjesa antifungalnih tvari u kombinaciji 14 (Tablica 8; Slika 13) je najučinkovitija i utvrđena je statistički vrlo značajna razlika u inhibiciji rasta *F. graminearum* u usporedbi s kontrolom ( $p < 0,01$ ). Ova kombinacija je reducirala rast *F. graminearum* pri aw 95 za 78% uz izazivanje stagnacije rasta. Stagnacija rasta je nastupila kada su plijesni u dva od tri ponavljana pokusa prestale rasti, najvjerojatnije zbog izazivanja oksidativnog stresa i posljedičnih teških oštećenja stanica, uključivo nasljednog materijala, koja su spriječila diobu. Prethodna istraživanja su utvrdila da istodobna primjena više antifungalnih tvari često pokazuje veću učinkovitost nego primjena samo jedne tvari. Istraživanja Reynoso i sur. (2002) pokazala su da dva antioksidansa (PP-BHA, PP-BHT, PP-THBP) mogu biti učinkovitija zajedno nego pojedinačno. Slično istraživanje su proveli Passone i sur. (2007) koji su utvrdili da mješavine dva antioksidansa BHA-PP (1802+3604 ppm; 3604+1802 ppm; 3604+3604 ppm) i tri antioksidansa BHA-PP-BHT (1802+1802+2204 ppm; 1802+3604+2204 ppm; 3604+1802+2204 ppm; 3604+3604+2204 ppm) su učinkoviti u kontroli fungalnog rasta roda *Aspergillus* i prevencije kontaminacije aflatoksinima. Istraživači su istaknuli prednost primjene mješavine antioksidanasa zbog njihovih različitih svojstava. Smjesa antifungalnih tvari u kombinaciji 14: BHA, T i PP su fenoli koji imaju sličan učinak na fungalnu stanicu. BHA i T kao lipofili umeću se u membranu plijesni i induciraju promjene u njenim fizikalno-kemijskim osobinama, narušavaju integritet membrane i povećavaju pasivni protok protona kroz membranu (Ben Arfa i sur., 2005). Parabeni imaju različite mehanizme djelovanja: inhibiraju funkcije različitih enzima, otapaju membranske lipide, utječu na transport nutrijenata, sintezu proteina, RNA i DNA i uništavaju membranski

potencijal (Eklund i sur., 1989). S kombinacijom 14 je postignuta zadovoljavajuća inhibicija rasta *F. graminearuma* uz 700 ppm ukupne koncentracije ispitanih tvari. Antifungalne tvari u ovoj kombinaciji bile su temelj daljnjih formuliranja smjesa tvari.

Ostale ispitane kombinacije (Tablice 9 i 10) podrazumijevale su primjenu BHA, T i PP uz zamjenu pojedinih sastojaka s drugim antifungalnim tvarima, ali uz održavanje minimalne ukupne koncentracije od 600 ppm. Kombinacija 16 (Slika 14) je imala četiri puta dužu lag fazu od kontrole uz 55% redukcije rasta pri 700 ppm ukupne koncentracije. PG, koji je između ostalih tvari sastojak ove kombinacije, pri koncentraciji od 4240 ppm nije bio učinkovit u inhibiciji radijalnog rasta *Aspergillus* sp. pri  $a_w$  0,937 (Nesci i sur., 2003). Giridhar i sur. (2001) su također zaključili kako je PG galat blagi inhibitor rasta plijesni *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrysa* i proizvodnje toksina (Giridhar i sur., 2001). Mješavine PP-BHT su značajno usporile rast *Fusarium* sp. pri 90 i 180 ppm na kukuruznom agaru (Reynoso i sur., 2002), dok je bilo potrebno čak 1000 ppm BHT za inhibiciju *A. flavus*, *P. citrinum* i *P. purpurogenum* na umjetnoj podlozi (Giridhar i sur., 2001). Iste tvari (PP-BHT) uz dodatak BHA i T (kombinacije 17 i 19) reduciraju rast plijesni za 50-52% što ne predstavlja značajno umanjeње rasta *F. graminearuma*. Najvjerojatniji uzrok tome je činjenica da prirodni supstrati zahtijevaju veće koncentracije u inhibiciji rasta plijesni u usporedbi s umjetnim hranjivim podlogama, što su zaključili i Torres AM i sur. (2003). Kombinacije 18 i 20 (700 ppm ukupne koncentracije) (Slika 15) reduciraju rast za 51-57% uz pet puta dužu lag fazu u usporedbi s kontrolom. Za uspješnu inhibiciju rasta *F. verticillioides* bilo je učinkovito 500 ppm TBHQ na umjetnom supstratu (Thompson, 1992) koji je jedan od sastojaka ovih kombinacija.

Kombinacija 22 (Tablica 11; Slika 16) reducira rast *F. graminearuma* za 70%. Heksenal, jedan od sastojaka ove kombinacije, je antifungalni agens koji inhibira micelijski rast fungalnih patogena *Alternaria alternata* i *Colletotrichum gloeosporioides* kod 450 ppm tj. 900 ppm za *Sclerotiniu sclerotiorum*. Antifungalni učinak heksenala ovisan je o koncentraciji, vremenu izloženosti i osjetljivosti patogena (Song i sur., 2007). Niže koncentracije BHA+T+PP u kombinaciji 23 rezultirale su slabijom učinkovitošću u usporedbi s kombinacijom 14 i 21.

Kombinacije prikazane u Tablici 12. nisu djelotvorne u inhibiciji rasta *F. graminearuma*. Kombinacija 24, ukupne koncentracije 650 ppm, jednako je učinkovita kao i kombinacija 18 (Tablica 10) s istim antifungalnim tvarima (ukupne koncentracije 700 ppm). Kombinacija 25 (BHA+T+K) reducira rast *F. graminearuma* za 46%. Drugi istraživači su sa smjesom K i T utvrdili blagu redukciju antimikrobne aktivnosti koja nije pokazala efekat

parcijalnog sinergizma ili sinergizma (Iten i sur., 2009). Thompson (1996) je, pak, opisao sinergistički učinak BHA i K na rast *Fusarium* sp. uz koncentraciju od 50 ppm svakog antioksidansa u krumpir-dekstroznom bujonu. Kombinacija ove tri tvari (BHA+T+K) ne pokazuje sinergistički učinak i ukupna primijenjena koncentracija od 700 ppm nije dovoljna u redukciji rasta plijesni na prirodnom supstratu kao što je krmna smjesa. *F. graminearum* se prilagođava uvjetima okoline, sintetizira potrebne enzime i nastavlja svoj rast i razvoj (Slika 17).

Kako se pri aw 0,95 kombinacija BHA+T+PP pokazala učinkovitom, ispitana je i pri nižim koncentracijama uz dodatak masnih kiselina (Tablica 13; Slika 18). Utvrđen je trend povećanja inhibitornog djelovanja povišenjem koncentracije svih sastojaka te je nadalje povećavan udio masnih kiselina ili udio antioksidanasa (Tablice 14 i 15). Strategija je uspješno inhibirala rast *F. graminearum* (Slike 19 i 20). Pored djelovanja antioksidanasa na fungalnu stanicu, masne kiseline dodatno dovode do promjena u staničnoj propusnosti (Avis i sur., 2001). Istraživači sugeriraju više mehanizama djelovanja masnih kiselina: moguće je da izazivaju promjene u fluidnosti membrane koje ovise o sadržaju sterola, a gljive bez sterola ili s njihovim malim sadržajem ne mogu puferirati promjene izazvane djelovanjem masnih kiselina na fluidnosti membrane (kao što mogu gljive s visokim sadržajem sterola) što dovodi do promjena u propusnosti membrane, oslobađanja intracelularnih elektrolita i proteina te citoplazmatsku dezintegraciju micelija i spora (Benyagoub i sur., 1996). Zatim, Avis i sur. (2001) su predložili mehanizam po kojem se masne kiseline umeću u hidrofobne regije fosfolipidnih membrana uzrokujući dezorganizaciju kiselinskih lanaca, što dovodi do konformacijskih promjena u membranskim proteinima i povećanja membranske propusnosti. Antifungalna aktivnost masnih kiselina možda je i rezultat inhibicije aktivnosti membranskih proteina (Benyagoub i sur., 1996).

Učinkovite smjese inhibitornih tvari na nižem aktivitetu (BHA+T+PP) ispitane su i kod višeg aktiviteta vode u krmnim smjesama (Tablica 16; Slika 21), međutim redukcija rasta iznosi samo 40%. Ispitani su i antifungalni učinci smjesa antioksidanasa (BHA+T+PP) i masnih kiselina srednjeg lanca uz trend povećanja koncentracije masnih kiselina. Povećanjem udjela masnih kiselina u smjesama (Tablice 17-19; Slike 22-24) uočljiva je stagnacije rasta *F. graminearum* koja najvjerojatnije nastaje umetanjem masnih kiselina u lipidni dvosloj membrana što dovodi do promjena u staničnoj propusnosti i dezintegracije citoplazme. Statistički značajna ( $p < 0,05$ ) inhibicija rasta plijesni u odnosu na kontrolni rast uočena je u kombinacijama 10, 11 i 12 uz 2650 do 2850 ppm ukupne koncentracije tvari. Ove smjese tvari uz BHA, T i PP čine C8, C10, C12 i C14. Veći udio vode u krmnoj smjesi omogućuje *F.*

*graminearumu* da brže metabolizira antioksidanse dok se masne kiseline mogu esterificirati do glicerida i/ili se oksidacijom degradirati u manje fragmente (Kabara i Marshall, 2005). Hajjaj i sur. (2000) sugeriraju da se masne kiseline s lancima dužim od 14 C atoma oksidiraju β-oksidacijom u mitohondrijima dok se masne kiseline srednjeg lanca oksidiraju u peroksisomima ili se prvo prevode u metilketone kako bi se umanjila njihova toksičnost (Hatton i sur., 1991).

Povećanje udjela antioksidanasa uz smanjenje udjela masnih kiselina (Tablica 20; Slika 25) nije značajno umanjilo stopu rasta ispitivane plijesni, a redukcija se kretala od 66 do 76%. Povećanjem udjela masnih kiselina za 600 ppm (Tablica 21; Slika 26) stopa rasta je smanjena uz 78% redukciju rasta *F. graminearuma*. Ove smjese tvari uz antioksidanse sadrže C8 i C10, a kako nije zabilježena stagnacija rasta, vjerojatno su plijesni uspjele metabolizirati masne kiseline u manje toksične metilketone.

Učinkovitost smjesa nije se poboljšala niti dodatkom 0,1% octene kiseline u smjesi s 250 ppm BHA, T i PP pri aw 0,98 u preliminarnom pokusu. *F. graminearum* je rastao 3,8 mm dnevno uz 26 dana inkubacije (kontrola: stopa rasta 13,5 mm dnevno, inkubacija 7 dana) i uz 4 dana lag faze. pH krmiva se dodatkom ove količine octene kiseline nije promijenio. Prilagodбом pH krmiva na 5,5 pri aw 0,95 i 0,98 spriječen je rast *F. graminearuma* pri najnižim primijenjenim koncentracijama smjesa tvari (po 100 ppm BHA, T i PP). Primjena krmiva s kiselim pH je u ishrani stoke poželjna jer niske pH vrijednosti nepovoljno djeluju na patogene kao što je *Escherichia coli*, a kao primjer se može navesti silaža kod koje se optimalan pH kreće od 3,5-4,2.

Pokušanim podešavanjem pH krmiva na 9 također nije poboljšana učinkovitost ispitanih tvari. Najučinkovitija smjesa bila je uz 200 ppm BHA, T i PP pri aw 0,98 uz stopu rasta od 3 mm dnevno, 30 dana inkubacije i 1 dan lag faze (kontrola: 10 mm dnevno uz 10 dana inkubacije).

Kao i na krmivu PPT-2 i na krmivu SK-D-N pri aw 0,95 kombinacije 1 i 2 (Tablica 22; Slika 27) u potpunosti inhibiraju rast *F. graminearuma* tijekom 75 dana inkubacije. Veća vlažnost supstrata (Tablice 23 i 24) i na krmivu SK-D-N omogućuje bolje preživljavanje ispitivane plijesni (Slike 28 i 29). Kombinacija 6 je najuspješnija uz 83%-tnu redukciju rasta gljive uz 900 ppm ukupne koncentracije antioksidanasa (BHA+T+PP) i 2000 ppm C8 i C10. Učinkovitost smjesa na rast plijesni kod aw 0,98 na krmnoj smjesi SK-D-N može se poboljšati i primjenom octene kiseline. Preliminarni pokus uz smjesu koja je sadržavala po 250 ppm BHA, T i PP, uz dodatak 0,1% octene kiseline, spriječio je porast plijesni. Sama kiselost krmiva je neznatno pala s 5,93 na 5,79. Pojedine plijesni su osjetljivije na prirodne



antimikrobne agense pri kiselom pH, tako su López-Malo i sur. (2002) ustanovili kako je *Aspergillus flavus* osjetljiviji na timol, eugenol i kravakrol pri pH 3,5. Također su ustanovili da se antifungalna učinkovitost timola ne mijenja znatno varijacijama pH u kiselom području (López-Malo i sur., 2005). Parabeni su kemijski stabilni u kiselom mediju (Soni i sur., 2005) kao što se i učinkovitost BHA ne mijenja promjenama pH (Jay i sur., 2005).

Uspoređujući antifungalne kombinacije na krmnoj smjesi PPT-2 (Tablica 15) sa smjesom SK-D-N (Tablica 22) pri  $a_w$  0,95, učinak im je identičan jer je rast plijesni na oba krmiva u potpunosti inhibiran. Pri višem aktivitetu vode uočljivo je kako su antifungalne tvari blago učinkovitije na krmivu SK-D-N (Tablice 23 i 24) u usporedbi s PPT-2 (Tablice 20 i 21). Na krmivu PPT-2 lag faza je tri do pet puta duža od kontrole uz redukciju rasta od 66 do 78%, a na krmivu SK-D-N lag faza je četiri do sedam puta duža od kontrole a redukcija se kreće od 44-83%. Krmna smjesa PPT-2 po svom sastavu je masnija (21% bjelančevina, 6% masti) za razliku od krmiva SK-D-N koji po sastavu sadrži 15% bjelančevina i 3% masti. Moguće je da u krmivu s manje masti više liposolubilnih tvari ostaje u vodenastoj frakciji krmiva odakle se koncentriraju u mebranama plijesni, za razliku od supstrata s više masti u kojima su antifungalne tvari koncentrirane u kapljicama masti i zapravo su odvojene od stanica plijesni. Sličan učinak je primijećen u hrani s visokim sadržajem masnoća i/ili proteina gdje su eterična ulja otopljena u lipidnoj fazi i samim time su manje pristupačna u djelovanju na bakterije koje se nalaze u vodenoj fazi (Burt, 2004).

## **5.2. Učinkovitost kombinacija i koncentracija antifungalnih tvari na rast**

### ***Fusarium verticillioides***

Na krmivu PPT-2 pri  $a_w$  0,95 smjese antifungalnih tvari u kombinaciji 1, 2 i 3 uzrokovale su duplo dužu lag fazu (Tablica 25; Slika 30), ali inhibicija rasta *F. verticillioides* pri ovim koncentracijama primijenjenih tvari nije bila dovoljno učinkovita. BHA je odabran kao stalni sastojak ispitivanih smjesa tvari zbog svojih antifungalnih osobina (Jay i sur., 2005), dok se drugi ispitivani antioksidansi u antifungalnim kombinacijama mijenjaju. Eugenol inhibira lipidnu peroksidaciju i biosintezu aflatoksina (Jayashree i Subramanyam, 1999), ali nije inhibitoran u rastu *F. verticillioides* (kombinacija 1 i 2). Heksenal u koncentraciji od 40-270 ppm reducira u potpunosti rast *Botrytis cinerea* (Utto i sur., 2008), ali 500 ppm ukupne koncentracije antifungalnih tvari nije dovoljno u supresiji rasta ispitivane plijesni (kombinacija 3).

Smjese prikazane u Tablici 26 i na Slici 31 su najmanje učinkovite u inhibiciji rasta *F. verticillioidea*. Ukupna koncentracija ispitanih tvari ne prelazi 500 ppm od čega 250 ppm BHA. Najučinkovitija je kombinacija 4 (BHA+PP) uz duplo dužu lag fazu od kontrolne, ali ipak nedovoljno snažna u inhibiciji rasta plijesni. Tretmanom s 200 ppm BHA i PP utvrđena je inhibicija konidijalne germinacije *Fusarium* sp. na umjetnom supstratu, s tim da je učinkovitost PP bila veća (Thompson, 1993). Kombinacija 6 je najmanje učinkovita i njena stopa rasta je identična kontrolnoj. Inhibitoran učinak K, koji je sastojak ove kombinacije, zabilježen je u koncentraciji od 1000 ppm, na sterilnom zrnu kukuruza u redukciji rasta *F. verticillioidea* (Velluti i sur., 2004a). Etoksikvin ima sposobnost detoksifikacije aflatoksina (Hayes i sur., 1998), ali ne pokazuje antifungalna svojstva u kombinaciji 7 pri 350 ppm ukupne koncentracije. Primijenjene koncentracije nisu dovoljne u inhibiciji rasta *F. verticillioidea* na supstratu krmne smjese. Slična zapažanja primijetili su i drugi istraživači (Gill i sur., 2002; Burt, 2004) koji su zaključili kako je moguće nakupljanje antioksidanasa i eteričnih ulja u hidrofobnom okruženju masnih ili proteinskih čestica hrane što smanjuje mogućnost njihovog djelovanja na stanice bakterija koje se nalaze u hidrofilnom okruženju. Isti autori pretpostavljaju kako veća pristupačnost nutrijenata u hrani u usporedbi s umjetnim hranjivim podlogama, omogućuje bakterijama i brži oporavak stanica.

Smjese tvari BHA s C i nezasićenim aldehidima (Tablica 27; Slika 32) reducirale su rast plijesni za 4 do 6%. Eterično ulje limunske trava čiji je glavni sastojak C također nije značajno inhibirao rast na sterilnom zrnu kukuruza tri ispitivana soja *F. verticillioidea* (Velluti i sur., 2004a).

Osim u kombinaciji 4, BHA+PP je ispitan i u većoj koncentraciji u kombinaciji 13 (Tablica 28; Slika 33). U ovoj koncentraciji antifungalni učinak je bio djelotvorniji uz skoro šest puta dužu lag fazu i redukcija rasta *F. verticillioidea* za 37%. Sukladno ovome, istraživanja Reynoso i sur. (2002) su utvrdila inhibitoran učinak kombinacije BHA i PP na rast *F. verticillioidea*, ali uz manje koncentracije od 90 i 180 ppm, na umjetnoj hranjivoj podlozi. Očigledno je da su antioksidansi u prirodnom supstratu, kao što je krmna smjesa, djelotvorni samo uz veće primijenjene koncentracije. Slično je utvrđeno za kombinaciju BHA i T (Tablice 27 i 28; Slike 32 i 33). Kombinacija 14, BHA+T+PP u ukupnoj koncentraciji od 700 ppm, reducira rast *F. verticillioidea* za 65% uz četiri puta dužu lag fazu u odnosu na kontrolu što je statistički vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ) u usporedbi s kontrolom.

Ostale ispitane kombinacije sadržavaju BHA, T i PP uz zamjenu pojedinog sastojka s drugim antifungalnim tvarima, ali uz minimalno 600 ppm ukupne koncentracije. Kombinacije prikazane u Tablicama 29 i 30 su slabo učinkovite, reduciraju rast od 29 do 43 % uz pet puta

dužu lag fazu u odnosu na kontrolu (Slike 34 i 35). U ovim smjesama uz BHA, T i PP, ispitana je i učinkovitost: PG, BHT, TBHQ i selenita. Ove tvari su blagi inhibitori rasta plijesni, a što su zaključili i drugi istraživači utvrdivši inhibiciju rasta pri 500 do 1000 ppm na umjetnim supstratima (Thompson, 1992; Giridhar i sur., 2001).

Najbolji učinci inhibicije rasta *F. verticillioidesa* kod aw 0,95, osim u kombinaciji 14, su primijećeni i u kombinacijama tvari 21 i 23. U kombinaciji 21 ( $p < 0,05$ ) rast je reduciran za 58%, a u kombinaciji 23 ( $p < 0,01$ ) za 67% (Tablica 31; Slika 36). Osim toga, ove antifungalne tvari su izazvale i stagnaciju u rastu plijesni što znači da su nakon određenog perioda rasta onemogućile daljnju diobu stanica *Fusariuma*. Stagnacija rasta je najvjerojatnije nastala kao posljedica oksidativnog stresa izazvanog visokim dozama fenola, pri čemu su reaktivni oblici kisika uzrokovali oštećenja lipida, proteina i DNA (Atsumi i sur., 2005). Kombinacija tvari BHA, T i PP bila je nešto uspješnija u supresiji rasta *F. graminearuma* (78% redukcije) uz utvrđenu statistički značajnu razliku ( $p < 0,01$ ) u inhibiciji rasta u usporedbi s kontrolom, također uz izazivanje stagnacije rasta. Sve tri tvari oštećuju staničnu membranu. BHA je membranski disruptor koji dovodi do promjena u permeabilnosti stanice, a samim tim do pojačanog istjecanja celularnih enzima, šećera, aminokiselina i proteina (Thompson, 1996; Simonetti i sur., 2003). Timol se veže vodikovim vezama za membranske proteine lipidnog dvosloja (Juven i sur., 1994) što narušava integritet membrane i dovodi do istjecanja citoplazmatskog sadržaja, dezorganizacije staničnih organela fungalnih konidija i gubitka stanične strukture i organizacije (Svircev i sur., 2007). Propil paraben remeti transport protona preko mitohondrijske i stanične membrane te time i proizvodnju energije i transport supstrata (Etcheverry i sur., 2002; Aldred i sur., 2008).

Dobar učinak inhibicije rasta primijećen je s antifungalnim tvarima prikazanima u Tablici 32 (Slika 37). Smjese čine BHA+T uz dodatak TBHQ ili K, koji imaju snažan antitubakterijski i antifungalni učinak (Paster i sur., 1990; Thompson, 1992; Elgayyar i sur., 2001).

Kombinacije uspješnih inhibitora rasta, BHA, T i PP, s masnim kiselinama (Tablice 33-35; Slike 38-40) pokazuju produljenu lag fazu i manju stopu rasta u usporedbi s kontrolom, ali ipak nedovoljno uspješno u usporedbi s kombinacijom BHA+T+PP (Tablica 31, Slika 36). Tek je dodatak od najmanje 600 ppm C8 i C10 uz po minimalno 100 ppm BHA+T+PP u potpunosti inhibirao porast plijesni kod aw 0,95 ili izazvao brzu stagnaciju kulture (Tablice 34-35; Slike 39-40). Ovo inhibitorno djelovanje moglo je nastati i zbog potencijalnog sinergističkog učinka primijenjenih antifungalnih tvari. Iten i sur. (2009) su utvrdili da kombinacije pojedinih sastojaka eteričnih ulja pokazuju antimikrobnu aktivnost

koja je rezultat zbroja njihova djelovanja, a naziva se i parcijalni sinergizam. Učinak samih masnih kiselina (Tablica 35; Slika 40) kod aw 0,95 očituje se kroz produženu lag fazu i 66% nižu stopu rasta *F. verticillioidea* u usporedbi s kontrolnom. Walters i sur. (2003) su utvrdili kako dodekanska kiselina u koncentraciji od 100 ppm reducira rast za više od 90% fitopatogena *Rhizoctonia solani* i *Pythium ultimum*. Tetradekanska i heksadekanska kiselina utječu na produženje lag faze *F. oxysporium* i *F. avenaceum* pri koncentracijama od 20-40 ppm na umjetnoj hranjivoj podlozi (Altier i sur., 2009).

Smjese tvari koje su se pokazale učinkovitima kod niže vlažnosti krmiva, trebale bi biti učinkovite i pri aw 0,98. Stoga su prve ispitane smjese tvari obuhvatile učinkovitu kombinaciju BHA+T+PP i BHA+T+PP uz dodatak C8 i C10. Ispitane kombinacije (Tablica 36; Slika 41) pri većem sadržaju vode u krmivu PPT-2 nisu pokazale značajniju inhibiciju rasta *F. verticillioidea*. Slično rezultatima s *F. graminearum* te drugih autora (Marin i sur., 1996; Etcheverry i sur., 2002), veća raspoloživost vode uvjetuje i skraćivanje trajanja lag faze.

Povećanjem udjela masnih kiselina uz istu koncentraciju antioksidanasa (Tablice 37-39; Slike 42-44) primjećuje se blago poboljšanje učinkovitosti u inhibiciji rasta plijesni. Kombinacija 11 i 12 pokazuju najbolju djelotvornost uz 44 do 47% redukcije rasta plijesni. Ove kombinacije sadržavaju od 2650 do 2850 ppm ukupne koncentracije antifungalnih tvari, ali veći udio vode omogućava ispitivanoj plijesni da brže metabolizira antifungalne tvari, i one ne izazivaju teža oštećenja stanica.

Povećanjem udjela antioksidanasa uz isti udio masnih kiselina (Tablica 40; Slika 45) postignuta je redukcija rasta od 63%. Ukupne koncentracije tvari su iznosile 2600 do 2750 ppm. Uspoređujući Tablicu 39 i Tablicu 40, očigledno je kako na inhibiciju rasta utječe povećanje koncentracije BHA, T i PP koji su odgovorni za oštećenja koja nastaju na staničnim membranama uzrokujući inhibiciju rasta. Same masne kiseline (kombinacija 16) reducirale su rast gljive za 56%, dok je redukcija rasta gljive uz kombinaciju 17 koja je uključivala samo antioksidanse iznosila 43%.

Učinak smjesa tvari nije se poboljšao niti dodatkom 0,1% octene kiseline u smjesu tvari koju čine po 200 ppm BHA, T i PP pri aw 0,98 u preliminarnom pokusu. Rast *F. verticillioidea* reduciran je za 62% uz 28 dana dužu inkubaciju u usporedbi s kontrolom. Nesci i sur. (2003) također nisu primijetili korelaciju između ispitane pH vrijednosti u rasponu od 6-8 i stope rasta roda *Aspergillus* na hranjivoj podlozi tretiranoj s BHA, PP, PG i BHT. pH krmne smjese iznosi 6,08 pa je i nedovoljna učinkovitost rezultat i nedovoljne disocijacije molekula octene kiseline. Najbolja antimikrobna učinkovitost octene kiseline

nastaje kada je 50% molekula disocirano što se naziva disocijacijskom konstantom (Nesci i sur., 2003), a koja iznosi za octenu kiselinu 4,8. Autori su uočili bolji učinak BHA u usporedbi s PP kod svih vrijednosti pH.

Podešavanjem pH krmiva na 9 uz različite smjese tvari BHA+T+PP (po 100 i 200 ppm) te uz kombinaciju oktanske i dekanske kiseline (400 ppm), u preliminarnom pokusu, nisu pokazale značajnu inhibiciju rasta *F. verticillioidea*. Kultura na krmivima s ovim kombinacijama su pokazale 68 do 76% kontrolnog rasta. *F. verticillioidea* dobro podnosi viši pH zbog prisustva *PAC1* gena. PacC je protein, transkripcijski aktivator gena odgovornih za rast u alkalnim uvjetima dok istovremeno ograničava ekspresiju gena odgovornih za rast u kiselom okolišu (Flaherty i sur., 2003).

Učinkovite smjese tvari na krmivu PPT-2 ispitane su i na krmivu SK-D-N kod aw 0,95. Kombinacija 1 i kombinacija 2 (Tablica 41; Slika 46) inhibiraju u potpunosti rast *F. verticillioidea*. Ova plijesan pri aw 0,98 i na krmivu SK-D-N, uz različite kombinacije i koncentracije (Tablica 42; Slika 47) uspješno nastavlja svoj rast. Najbolji učinak ostvaren je u kombinaciji 1 i 2 sa smjesama BHA, T, PP i masnih kiselina uz redukciju rasta od 53 do 61%. Fenolne komponente ove antifungalne kombinacije tvari izazivaju oštećenja membrane plijesni što reducira njen rast.

Dodatak 0,1% octene kiseline u smjesu tvari koju čine po 200 ppm BHA, T i PP pri aw 0,98 u krmnu smjesu SK-D-N nije povećao učinkovitost ispitanih tvari. Ova smjesa je imala fazu suzdržanog rasta plijesni od devet dana, ali je redukcija iznosila samo 37% uz 14 dana dužu inkubaciju od kontrolne.

Uspoređujući antifungalne tvari na krmnoj smjesi PPT-2 (Tablica 35) i SK-D-N (Tablica 41) pri aw 0,95 djelotvornost samih masnih kiselina je bolja na krmivu SK-D-N gdje je rast plijesni bio u potpunosti inhibiran. Pri većoj vlažnosti supstrata u smjesama tvari antioksidanasa i masnih kiselina primjećuje se redukcija od 62 do 63% na krmivu PPT-2 (Tablica 40) a na krmivu SK-D-N 53 do 61% (Tablica 42). Masne kiseline bolje djeluju na krmivu PPT-2 uz redukcija rasta od 56%, dok je na krmivu SK-D-N ona iznosila 21%. Antioksidansi pokazuju nešto bolji učinak na krmivu PPT-2 uz redukciju od 43% dok je na krmivu SK-D-N redukcija rasta 33%. Kao što je veće i rečeno, sastav supstrata utječe na djelotvornost primijenjenih antifungalnih tvari.

Kombinacije antifungalnih antioksidanasa i masnih kiselina ispitane su na sterilnim krmnim smjesama, međutim prirodne supstrate karakterizira mješavina mikroorganizama koja ga kolonizira prije i poslije žetve, a dominacija pojedinih vrsta je ovisna o abiotskim i biotskim faktorima (Marin i sur., 1998d). Isti autori u svom istraživanju su zabilježili

reduciranu prisutnost *Aspergillus flavus*, *A. niger* i *A. ochraceus* u prisutnosti *F. verticillioides* i *F. proliferatum* posebice pri 15°C i aw 0,95 – 0,98 na zrnu kukuruza. Međutim, pri nižem aktivitetu vode od 0,93 – 0,95 u rastu dominiraju *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp. nasuprot *Fusarium* sp. Iz toga razloga daljnja istraživanja bi trebala obuhvatiti interakcije između vrsta na nesteriliziranim krmnim smjesama i ispitati njihov utjecaj na učinkovitost antioksidanasa i masnih kiselina. Nadalje, vjerojatnost pojave visoke vlažnosti u skladištima i silosima je relativna mala zbog postupka prozračivanja uskladištenog materijala. Naravno, moguće je stvaranje mokrih točaka s povoljnim uvjetima za fungalni rast jer se intenzivnim disanjem zrna povećava relativna vlaga i povisuje se temperatura uskladištene mase što dovodi do samozagrijavanja zrna, stvarajući idealne uvjete za razvoj toksigenih plijesni (Kabak i sur., 2006; Magan i sur., 2007).

Rast mikotoksikogenih plijesni u uskladištenom materijalu ovisan je o nizu parametara: o abiotskim faktorima, prvenstveno o količini prisutne vode i temperaturi, biotskim interakcijama s drugim vrstama plijesni, sastavu supstrata. Stoga će učinkovitost antifungalnih i antimikotoksikogenih tvari u skladištima i silosima biti ovisna o njihovim interakcijama.

### **5.3. Trihoteceni tipa B u krmnim smjesama PPT-2 i SK-D-N**

Pri aw 0,95 (Slika 48) ispitane kombinacije nisu bile uspješne u inhibiciji biosinteze trihotecena. Velluti i sur. (2004c) su zabilježili da pri aw 0,95 izostaje antifungalno inhibitorno djelovanje eteričnih ulja na sintezu DON-a. Povećanjem aktiviteta vode od 0,94 do 0,99 povećava se i sinteza deoksinivalenola, zaključili su Ramirez i sur. (2006). Kombinacije 5 i 6 (Slika 49) u potpunosti su inhibirale rast *F. graminearum* što je uzrokovalo i nemogućnost biosinteze trihotecena tipa B na krmivu PPT-2.

Pri aktivitetu vode od 0,98 nijedna kombinacija antifungalnih tvari nije učinkovito inhibirala sintezu trihotecena tipa B (Slike 50 i 51). Ove antifungalne tvari nisu bile dovoljno inhibitorne ni u redukciji radijalnog rasta *F. graminearum* (Tablice 16 i 17; Slike 21 i 22). Veća vlažnost supstrata i primijenjene koncentracije omogućuju *F. graminearum* da metabolizira antioksidanse i masne kiseline te nastavlja rast i sintezu trihotecena tipa B. Ispitane smjese očigledno vrlo stresno utječu na *F. graminearum* te je utvrđena stimulacija sinteze DON-a uz statistički značajnu razliku između ispitanih kombinacija i kontrole (Slike 50 i 51). Stimuliranu proizvodnju deoksinivalenola zabilježili su i drugi autori (Magan i sur., 2002; Ramirez i sur., 2004) pri primjeni suboptimalnih koncentracija fungicida na zrnu

pšenice. Nisu jasni mehanizmi po kojemu fungicidi stimuliraju proizvodnju toksina u *Fusarium* sp. Može se pretpostaviti kako visoke koncentracije određenih fungicida rezultiraju povećanom proizvodnjom sekundarnih metabolita uključujući mikotoksine kao odgovor gljive na stresne uvjete (Ramirez i sur., 2004). Uočljiva je i pojava nivalenola i acetiliranih formi DON-a kada se u antifungalne kombinacije uključene masne kiseline. Acetilirane forme imaju manju toksičnost u ljudi i životinja (Eriksen i sur., 2004b), a acetilacija i deepoksidacija su dva moguća mehanizma smanjenja toksičnosti trihotecena tipa B (Kimura i sur., 2006). Acetilacija trihotecena je detoksifikacijski proces koje koriste vrste roda *Fusarium* kako bi se zaštitile od svojih vlastitih toksina (Boutigny i sur., 2008). Daljnjim istraživanjima bi se trebalo detaljnije utvrditi koje tvari i u kojim koncentracijama potiču izazivanje acetilacije, jer bi se na taj način postigla i uspješna detoksifikacija krmiva.

Pravilnik o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje objavljenim u Narodnim novinama Republike Hrvatske br. 118/2007, propisuje najveće dopuštene količine DON-a u dopunskim i potpunim krmnim smjesama do 2 ppm, dok je dopuštena količina u dopunskih i potpunih krmnih smjesa za svinje iznosi 0,5 ppm, uz udio vode u hrani za životinje od 12%. Koncentracije trihotecena tipa B u rezultatima ovog istraživanja izražene su na suhu tvar, a koncentracije u vlažnom uzorku pri  $a_w$  0,95 se kreću se od 4,4 do 10,9 ppm DON-a tj. preračunato na 12% vlage: od 1,8 do 4,7 ppm DON-a. Pri  $a_w$  0,98 koncentracije u vlažnom uzorku su od 20 do 78% manje od koncentracije u suhom uzorku i kreću se od 7,6 do 21,3 ppm DON-a tj. preračunato na 12% vlage od 2,2 do 6,3 ppm. Dakle, koncentracije u ispitanim uzorcima prelaze granice dozvoljenih količina DON-a u krmivima.

Preliminarnim ispitivanjem dodatka 0,1% octene kiseline u krmnu smjesu PPT-2 koja sadrži 250 ppm BHA, T i PP pri  $a_w$  0,98, nije postignuta učinkovita inhibicija biosinteze trihotecena tipa B. Zabilježeni pH krmiva je bio 6,08. Nedostatan učinak octene kiseline najvjerojatnije je nastao zbog nedovoljne disocijacije molekula octene kiseline (Nesci i sur., 2003).

Podešavanjem krmiva na pH 9 također nije inhibirana biosinteza mikotoksina. Međutim, istraživanja Roinestada i sur. (1994) su pokazala kako  $\text{NaHCO}_3$  reducira proizvodnju trihotecena kod *F. tricinctuma*, a koji nastaje zbog inhibicije mevalonat kinaze uslijed visokog pH (8,7) i nemogućnosti stvaranja daljnjih prekursora bitnih za sintezu trihotecena.

Na krmnoj smjesi SK-D-N pri  $a_w$  0,95 kombinacije 1 i 2 (Slika 52) su u potpunosti inhibirale rast *F. graminearuma* i sintezu trihotecena tipa B.

Na krmivu SK-D-N pri aw 0,98 sve ispitane kombinacije, osim kombinacije 6, su stimulirale sintezu DON-a, pri čemu su utvrđene statistički značajne razlike između ispitanih kombinacija i kontrole (Slika 53). Kombinacija 6 je blago inhibirala biosintezu trihotecena tipa B, što je dobar temelj za daljnja istraživanja. Ove kombinacije tvari nisu bile ni dovoljno inhibitorne u redukciji radijalnog rasta *F. graminearum* (Tablice 23 i 24; Slike 28 i 29) iako je uočljiv trend smanjenja stope rasta povećanjem koncentracije antioksidanasa i masnih kiselina, biosinteza trihotecena tipa B ne prati isti uzorak.

Koncentracije trihotecena tipa B u krmnoj smjesi SK-D-N preračunate na vlažni uzorak i 12% vlage se kreću od 0,73 do 8,8 ppm, što ne zadovoljava Pravilnik o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje.

*F. graminearum* podjednako dobro raste na oba ispitivana krmiva. Koncentracije trihotecena tipa B pri istim primijenjenim smjesama tvari su niže na krmivu PPT-2 nego na krmivu SK-D-N, što bi se moglo pripisati boljoj dispergiranosti lipofilnih sastojaka antifungalnih smjesa BHA i T u masnijem krmivu (PPT-2). Ovo krmivo po sastavu ima veći udio masnoća u odnosu na krmnu smjesu SK-D-N. U obje krmne smjese sinteza trihotecena tipa B je bila u velikoj većini slučajeva stimulirana dodacima. Pored mogućnosti jačeg antifungalnog djelovanja uslijed učinkovitije raspršenosti sastojaka, zamislivo je i da više masti samo podrazumijeva koncentriranje lipofilnih antioksidanasa u frakcijama krmiva koje plijesni slabije koloniziraju. Posljedica ovoga bi mogla biti slabija stimulacija sinteze mikotoksina.

#### **5.4. Fumonizini B1 i B2 u krmnoj smjesi PPT-2 i SK-D-N**

Analizom podataka utvrđena je statistički značajna razlika između kombinacije 1 i kontrole u proizvodnji fumonizina B1 i B2 u krmivu PPT-2 pri aw 0,95 (Slika 54). Velluti i sur. (2004a) su također utvrdili signifikantnu stimulaciju proizvodnje FB1 pri aw 0,95 na ozračenom zrnu kukuruza tretiranom s eteričnim uljima cimeta i klinčića, koja nastaje pod određenim stresnim okolišnim abiotskim uvjetima. Kombinacija 2 ima slab inhibitoran učinak na biosintezu FB1 i FB2 u usporedbi s kontrolom.

Kombinacija 5 (Slika 55) inhibirala je u potpunosti rast *F. verticillioidea* pa je i sinteza fumonizina B1 i B2 onemogućena. Ovu kombinaciju čini smjesa tvari antioksidanasa i masnih kiselina koji zajedno oštećuju membrane stanica *F. verticillioidea* te onemogućavaju njegov rast. Kombinacija 6 je bila uspješna u inhibiciji fungalnog rasta uz 56%-tnu redukciju, dok je količina sintetiziranog FB1 bila reducirana za 48%, a FB2 za 44% uz utvrđenu



statistički značajnu razliku u usporedbi s kontrolom ( $p < 0,05$ ). Uz djelovanje antioksidanasa na stanice plijesni, masne kiseline izazivaju citoplazmatsku dezintegraciju micelija *F. verticillioidea* kao što su utvrdili i Avis i sur. (2001).

Sve ispitane kombinacije (Slike 56 i 57) osim kombinacija 1 i 8 su značajno smanjile razinu FB1 i FB2 u usporedbi s kontrolom na krmnoj smjesi PPT-2 pri  $a_w$  0,98. Kombinacije 7 i 11 su najučinkovitije uz 98%-tnu redukciju nakupljanja fumonizina B1 i 90-92%-tnu redukciju FB2. Navedene kombinacije tvari nisu značajno reducirale radijalni rast gljive (Tablice 37 i 40; Slike 42 i 45). Drugi autori su također zaključili kako smanjeno nakupljanje fumonizina ne podrazumijeva ujedno i inhibiciju micelijskog rasta *F. verticillioidea* (Velluti i sur. 2004a). Hajjaj i sur. (2000) su utvrdili da masne kiseline s dužim ugljikovim lancima jače inhibiraju proizvodnju citrinina. Ustanovili su i da je citrinin, kao i drugi mikotoksini, osjetljivi na vodik peroksid, koji nastaje oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima. Nasuprot svim ostalim ispitanim kombinacijama, dodatak po 150 ppm BHA, T i PP te 200 ppm C14 stimulira sintezu mikotoksina. Moguće je da nedovoljan udio C14 onemogućava stvaranje vodika peroksida koji razgrađuje fumonizine.

Dodatak 0,1% octene kiseline u smjesu tvari koja sadrži po 200 ppm BHA, T i PP u krmnoj smjesi PPT-2 pri  $a_w$  0,98 također ima inhibitoran učinak na sintezu fumonizina. Ova smjesa reducira sintezu FB1 za 97% i sintezu FB2 za 95% što je statistički vrlo značajna razlika između ispitivanih uzoraka i kontrole. Fenolne komponente i organske kiseline povećavaju antifungalnu aktivnost povećavanjem hidrofobnosti (Kurita i Koike, 1983) što dodatno povećava antifungalni učinak tvari.

Preliminarno, ispitan je i utjecaj lužnatog pH na sintezu i/ili nakupljanje fumonizina. Krmiva su uz pH 9 dovele do gotovo potpune inhibicije sinteze FB1, pri čemu je najviša koncentracija FB1 u kontrolnom uzorku iznosila  $0,59 \pm 0,33$  ppm, dok su najviše vrijednosti FB2 bile  $6,47 \pm 2,89$  ppm suhe tvari krmiva. U smjesama tvari, od 100 i 200 ppm BHA, T i PP, te smjese od 150 ppm BHA, T, PP uz C8 i C10 (po 400 ppm) ili 600 ppm C14, uz prilagodbu pH, potpuno je inhibirana sinteza FB1 i FB2. Redukciju sinteze trihotecena kod *F. tricinctuma* uslijed inhibicije biosintetskih enzima, zbog visokog pH, utvrđen je i prije Roinestad i sur. (1993) i Roinestad i sur. (1994), a vjerojatan je i sličan odgovor *F. verticillioidea* na visoke vrijednosti pH. Prisustvo pH regulatornog gena, Pac1, može imati ulogu u supresiji biosinteze fumonizina u alkalnim uvjetima zaključili su Flaherty i sur. (2003). Potrebna su dodatna istraživanja o učinku alkalnih pH vrijednosti krme na zdravlje životinja i kvalitetu mesa.

Kombinacije 1 i 2 (Slika 58) na krmnoj smjesi SK-D-N pri aw 0,95 u potpunosti su inhibirale rast *F. verticillioidea* pa nije došlo ni do sinteze FB1 i FB2. Kombinacija prethodno dokazanih antifungalnih tvari (BHA+T+PP) s masnim kiselinama uspješno se nadopunjuju u svom djelovanju na *F. verticillioidea*. Niži sadržaj vlage supstrata onemogućava plijesan da uspješno metabolizira antifungalne tvari a posljedica je potpuni izostanak rasta plijesni.

Pri aw 0,98 kombinacija 2 (Slika 59) reducira sintezu FB1 za 57% ( $p < 0,05$ ) i FB2 za 32% u krmnoj smjesi SK-D-N pri aw 0,98. Reducirana sinteza fumonizina mogla je nastati i zbog potencijalnog sinergističkog djelovanja primijenjenih antifungalnih tvari. U kombinaciji 1 je zabilježen povećan sadržaj fumonizina B1 za 38% ( $p < 0,05$ ) i FB2 za 86% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolni uzorak. Inhibitoran učinak tvari s kombinacijom 2 je nedovoljan u zadovoljavanju zakonskih propisa o razini fumonizina FB1+FB2 u stočnoj hrani za životinje. Količina FB1 i FB2 iznosi 9,2, odnosno 5,2 ppm preračunato na 12% vlage. Ova kombinacija nije učinkovita kao na krmnoj smjesi PPT-2 gdje je razlika u redukciji razine fumonizina između kombinacije i kontrole bila statistički vrlo značajna (Slika 57). U krmnoj smjesi PPT-2 sve kombinacije koje imaju statistički značajnu manju količinu fumonizina u usporedbi s kontrolom zadovoljavaju količine fumonizina propisane Pravilnikom (FB1: 0,2 do 5,9 ppm, FB2: 0,2 do 2,4 ppm). Prema Pravilniku o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje (Narodne novine RH br. 118/2007) propisuju se najveće dopuštene količine u dopunskim i potpunim krmnim smjesama i to za svinje 5 ppm, a za perad 20 ppm.

Dakle, sastav krmiva očigledno utječe na učinkovitost smjesa tvari. Krmna smjesa SK-D-N u svome sastavu ima više ugljikohidrata od krmiva PPT-2. Devlieghere i sur. (2004) primjećuju kako visoke koncentracije škroba (30%) inhibiraju antimikrobnu aktivnost hitozana, dok su Gutierrez i sur. (2008) primijetili manji antimikrobni učinak eteričnih ulja pri visokim koncentracijama škroba.

Učinkovitost ispitanih smjesa se nije poboljšala niti dodatkom 0,1% octene kiseline (po 200 ppm BHA, T i PP) u krmnu smjesu SK-D-N pri aw 0,98. Ova smjesa pokazuje statistički značajno višu razinu fumonizina: koncentracija fumonizina B1 je dosegla 131%, a fumonizina B2 161% kontrolnog uzorka.

*F. verticillioidea* podjednako dobro raste na oba ispitana krmiva. Koncentracije fumonizina B1 i B2 pri istim primijenjenim kombinacijama tvari manje su na krmivu PPT-2 što se može pripisati boljoj otopljenosti aktivnih tvari primijenjenih antioksidanasa i masnih kiselina u masnijem krmivu što utječe na veću djelotvornost antifungalnih smjesa tvari i posljedičnu snažniju inhibiciju sinteze fumonizina B1 i B2.

Daljnja istraživanja učinkovitosti antifungalnih kombinacija tvari bi trebala obuhvatiti i druge abiotičke faktore (temperatura, pH) koji uz pristupačnost vode utječu na pojavu mikotoksikogenih plijesni u skladištima i silosima. Zatim, bitan je i utjecaj biotskih interakcija na učinkovitost antioksidanasa i masnih kiselina. Istraživanja Marin i sur. (1998d) su pokazala kako prisutnost *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* i *A. flavus* stimulira sintezu fumonizina, dok je u prisutnosti *Penicillium implicatum* zabilježeno smanjenje njegove sinteze. Inhibicija sinteze fumonizina primijećena je i u prisutnosti *F. graminearum* pri 15°C, dok je pri 25°C ona bila stimulirana (Velluti i sur., 2000b). Nadalje, treba uzeti u obzir i sastav supstrata s obzirom na lipofilnost antifungalnih sastojaka i udio masnoća u krmivima. Daljnja istraživanja bi trebala detaljno utvrditi i koje tvari potiču izazivanje acetilacije trihotecena, jer bi se na taj način postigla i uspješna detoksifikacija krmiva.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovi provedenih istraživanja o utjecaju smjesa tvari antioksidanasa i masnih kiselina na inhibiciju rasta *F. graminearuma* i *F. verticillioidea* i na inhibiciju sinteze trihotecena tipa B te fumonizina B1 i B2 na odabranim krmnim smjesama, može se zaključiti sljedeće:

- Smjese tvari BHA, T i PP (200 do 250 ppm) su najučinkovitije u supresiji rasta *F. graminearuma* pri aw 0,95 na krmnoj smjesi PPT-2. Ove kombinacije reducirale su rast od 78 do 81%.
- Dodatak C8 i C10 (400 do 600 ppm) u smjese tvari koje sadrže BHA+T+PP (150 do 250 ppm) sprječavaju porast *F. graminearuma* na krmivima PPT-2 i SK-D-N pri aw 0,95.
- Rast *F. graminearuma* na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 je značajno inhibiran uz kombinacije BHA+T+PP (po 150 ppm) i dodatak masnih kiselina (minimalno po 1000 ppm C8, C10, C12 ili C14). Česta je stagnacija rasta.
- Prilagodбом krmiva PPT-2 na pH 5,5 u potpunosti je inhibiran rast *F. graminearuma* pri najnižim primjenjenim koncentracijama smjesa tvari (po 100 ppm BHA, T i PP) pri aw 0,95 i 0,98.
- Dodatak 0,1% octene kiseline u krmnoj smjesi SK-D-N uz 250 ppm BHA, T i PP pri aw 0,98 inhibira u potpunosti rast *F. graminearuma*.
- Najbolji inhibitorni učinak na rast *F. verticillioidea* imaju smjese tvari BHA+T+PP (200 do 250 ppm) na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 uz 65 do 67% redukcije rasta.
- Masne kiseline srednjeg lanca (minimalno 600 ppm) dodane gornjoj kombinaciji inhibiraju u potpunosti rast ove plijesni na oba krmiva, pri čemu i same C8 i C10 (po 800 ppm) sprječavaju porast na krmivu SK-D-N pri aw 0,95.
- Rast *F. verticillioidea* pri aw 0,98 na krmnoj smjesi PPT-2 nije bio značajno reduciran niti u jednoj od kombinacija antifungalnih tvari, osim izazivanja stagnacije rasta uz minimalno 150 ppm BHA, T, PP i 800 ppm C8, C10 i C14.
- Potrebno je minimalno 700 ppm ukupne koncentracija pri aw 0,95 i 2650 ppm pri aw 0,98 za uspješnu inhibiciju rasta *F. graminearuma*. Rast *F. verticillioidea* pri aw 0,95 je uspješno inhibiran s minimalno 600 ppm ukupne koncentracije, dok ni najveća primijenjena koncentracija od 2850 ppm pri aw 0,98 nije inhibirala rast.
- Kombinacije BHA, T i PP (po 150 i 200 ppm) te ove smjese (po 250 i 300 ppm) uz C8 i C10 (i do 1000 ppm) na obje krmne smjese pri aw 0,98, uzrokuju

statistički značajno višu produkciju trihotecena tipa B (uglavnom deoksinivalenola) u usporedbi s kontrolom.

- Smjese tvari BHA, T i PP (po 100 ppm) potiču proizvodnju fumonizina pri  $a_w$  0,95 na PPT-2, dok same masne kiseline (800 ppm C8 i C10) reduciraju nakupljanje ovih mikotoksina. Slično, smjese za koje se pretpostavlja da izazivaju najjači oksidativni stres u stanicama plijesni (minimalno po 150 ppm BHA, T i PP i po 400 ppm C8 i C10), bile su najuspješnije u supresiji nakupljanja fumonizina pri  $a_w$  0,98.
- Iste smjese tvari imaju bolji antimikotoksikogeni učinak na krmivu PPT-2 nego na krmivu SK-D-N. Najučinkovitija na potonjem krmivu bila je kombinacija koja je sadržavala po 250 ppm BHA, T i PP i po 1000 ppm C8 i C10. Krmna smjesa PPT-2 ima veći udio masnoća što je možda pridonijelo boljoj dispergiranošću lipofilnih sastojaka antifungalnih smjesa.
- Dodatak 0,1% octene kiseline u smjesu tvari koja sadrži po 200 ppm BHA, T i PP reducira sintezu FB1 za 97% i sintezu FB2 za 95%. U smjesama tvari od minimalno 100 ppm BHA, T i PP uz dodatak masnih kiselina i prilagodbu krmiva na pH 9, potpuno je inhibirana sinteza FB1 i FB2.
- Navedeni rezultati predstavljaju prve podatke o antifungalnom i antimikotoksikogenom učinku antioksidanasa, sastojaka eteričnih ulja i masnih kiselina na krmnim smjesama.
- Pri formuliranju antifungalnih i antimikotoksikogenih kombinacija tvari treba uzeti u obzir abiotske i biotske interakcije ispitivanih plijesni, što bi trebao biti i temelj daljnjih istraživanja. Isto tako daljnja ispitivanja bi trebala obuhvatiti i utjecaj antioksidanasa i masnih kiselina na kvalitetu proizvoda animalnog podrijetla i prihvatljivost takvih krmiva domaćim životinjama.
- Kvalitativni i kvantitativni sastav krmnih smjesa, naročito obzirom na lipofilnost antifungalnih sastojaka i udio masnoća u krmivima, također treba uzeti u obzir pri formuliranju antifungalnih kombinacija tvari.
- BHA i PP dozvoljeni su aditivi prema EU Pravilniku o aditivima u krmivima. Prema Pravilniku o kakvoći stočne hrane RH krmnim se smjesama mogu dodavati mirisna sredstva i sredstva za poboljšanje okusa prirodnog podrijetla, a u ovu kategoriju bi se mogao svrstati i T, kao frakcija eteričnog ulja majčine dušice ili origana. Europska komisija registrirala je masne kiseline kao poboljšivače okusa u hrani i smatra se kako ne predstavljaju opasnost za javno zdravlje. Osim toga

izvori masnih kiselina mogu biti i prirodnog podrijetla kao što su kokosovo ulje ili ulje muškarnog oraščića. Ispitane smjese antifungalnih i antimikotoksikogenih tvari manje su toksične, financijski su povoljnije, a posjeduju i antioksidativno djelovanje te ujedno štite stočnu hranu od kvarenja.

## **7. LITERATURA**



- Abbaas HK, Shier WT, Seo JA, Lee YW, Musser, SM. 1998. Phytotoxicity and cytotoxicity of the fumonisin C and P series of mycotoxins from *Fusarium* spp. fungi. *Toxicon* 36: 2033-2037.
- Agag BI. 2005. Mycotoxins in foods and feeds, 5-trichothecenes, T-2 Toxin. *Assiut University Bulletin for Environmental Researches* 8: 107-124.
- Ahmand S, Branen AL. 1981. Inhibition of mold growth by butylated hydroxyanisole. *Journal of Food Science* 46: 1059–1063.
- Akgül A, Kıvanç M. 1988. Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 6: 263-268.
- Al-Bayati AF. 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 116: 403–406
- Aldred D, Magan N. 2004. Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters* 153:165–171.
- Aldred D, Cairns-Fuller V, Magan N. 2008. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. *Journal of Stored Products Research* 44: 341-346.
- Aldunate J, Coloma-Torres L, Spence P, Morello A, Ojeda JM, Repetto Y. 1992. Effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) on *in situ* mitochondria of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Letters* 303: 73-76
- Altieri C, Bevilacqua A, Cardillo D, Sinigaglia M. 2009. Antifungal activity of fatty acids and their monoglycerides against *Fusarium* spp. in a laboratory medium. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 242-245.
- Arras G, Usai M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection* 64: 1025-1029.
- Atroshi F, Rizzo A, Biese I, Veijalainen P, Saloniemi H, Sankari S, Andersson K. 1999. Fumonisin B-induced damage in rat liver and spleen: Effects of pretreatment with coenzyme Q, L-carnitine,  $\alpha$ -tocopherol and selenium. *Pharmacological Research* 40: 459-467.

- Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaka K. 2005. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicology in Vitro* 19: 1025–1033
- Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A. 2004. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology* 42: 817–24
- Avis TJ, Belanger RR. 2001. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid *cis*-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 956-960.
- Aziz NH, Moussa LLA. 2002. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control* 13: 281-288.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential use. *Analytical, Nutritional and Chemical Methods* 99: 191-203.
- Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 235-244.
- Bata Á, Lásztity R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology* 10: 223-228.
- Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* 43: 149–154.
- Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16: 497-516.
- Benyagoub M, Willemot C, Bélanger RR. 1996. Influence of a subinhibitory dose of antifungal fatty acids from *Sporothrix flocculosa* on cellular lipid composition in fungi. *Lipids* 31:1077–1082.
- Berdikova Bohne VJ, Hamre K, Arukwe A. 2007. Hepatic metabolism, phase I and II biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L) during a 12 week feeding period with graded levels of the synthetic antioxidant, ethoxyquin. *Food and Chemical Toxicology* 45: 733–746.
- Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson O, Thormar H. 2001. *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 3209-3212.

- Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137: 265-282.
- Bondy GS, Barker MG, Lombaert GA, Armstrong CI, Fernie SM, Gurofsky S, Huzel V, Savard ME, Curran IHA. 2000. A comparison of clinical, histopathological and cell-cycle markers in rats receiving the fungal toxins fumonisin B<sub>1</sub> or fumonisin B<sub>2</sub> by intraperitoneal injection. *Food and Chemical Toxicology* 38: 873-886.
- Bottalico A. 1998. *Fusarium* disease of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80: 85-103.
- Boutigny AL, Forget FR, Barreau C. 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* 121: 411–423.
- Branen AL, Davidson PM, Katz B. 1980. Antibacterial properties of phenolic antioxidants and lipids. *Food Technology* 34: 42-63.
- Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. 2005. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 256–267.
- Brul S, Cotte P. 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50: 1–17.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253.
- Buyukleyla M, Rencuzogullari E. 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 943–947.
- Carmo ES, Lima ED, Souza EL, Sousa FB. 2008. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 91-97
- Chadeganipour M, Haim A. 2001. Antifungal activities of pelargonic and capric acid on *Microsporum gypseum*. *Mycoses* 44: 109-112.
- Chu FS, Li GY. 1994. Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 847–852.
- Ciacchi-Zanella JR, Jones C. 1999. Fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin contaminant of cereal grains, and inducer of apoptosis via the tumor necrosis factor pathway and caspase activation. *Food and Chemical Toxicology* 37: 703-712.

- Clements MJ, Maragos CM, Pataky IK, White DG. 2004. Sources of resistance to fumonisin accumulation in grain and *Fusarium* ear and kernel rot of corn. *Genetics and Resistance* 94: 251-260.
- Codex Alimentarius Commission. 2002. Proposed draft code of practice for the prevention (reduction) of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes. CX/FAC 02/21, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rotterdam, Nizozemska.
- Creppy EE. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19–28.
- Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Šegvić M. 2005. Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from non-harvested maize. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 56: 275-280.
- Čonková E, Laciaková A, Kováč G, Seidel H. 2003. Fusarial toxins and their role in animal diseases. *Veterinary Journal* 165: 214-220.
- Ćosić J. 1997. *Fusarium* spp. na pšenici i otpornost nekih genotipova na palež klasova. Magistarski rad. Sveučilište J. J. Strossmayera, Osijek.
- Ćosić J, Jurković D, Drezner G. 1999. *Fusarium* vrste utvrđene na korijenu i vlati pšenice u istočnoj Hrvatskoj. *Poljoprivreda* 5: 7-12.
- Ćosić D. 2001. Taksonomija *Fusarium* vrsta izoliranih s kultiviranog bilja, korova i njihova patogenost za pšenicu. Doktorska disertacija. Sveučilište J. J. Strossmayera, Osijek.
- Ćosić J, Jurković D. 2001. *Fusarium* vrste s različitih domaćina i njihova patogenost za klijance pšenice. *Poljoprivreda* 7: 5-10.
- Ćosić J, Vrandečić K, Svitlica B. 2004. *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. *Poljoprivreda* 10: 9-14.
- Ćosić J, Jurković D, Vrandečić K, Šimić B. 2007. Pathogenicity of *Fusarium* species to wheat and barley ears. *Cereal Research Communications* 35: 529-532.
- Ćosić J, Vrandečić K, Šimić B, Poštić J, Baličević R. 2008. *Fusarium* species isolated from debris in eastern Croatia. *Cereal Reserach Communications* 36: 55-58.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Protection* 22: 39–44.
- Dambolena JS, López AG, Cánepa MC, Theumerc MG, Zygadlo JA, Rubinsteinc HR. 2008. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon* 51: 37–44.

- Desjardins AE, Plattner RD, Proctor RH. 1996. Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2571-2576.
- Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21: 703–714
- D’Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80: 183-205.
- Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB, Garcia CC, Michis F, Almeida NV, De Lampasona MP, Schuff C, Damonte EB. 2005. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 16: 247-251.
- Eklund T. 1989. Organic acids and esters. Mechanisms of action of food preservation procedures. Elsevier Applied Science, New York.
- Ellend N, Binder J, Krska R, Horvath EM. 1997. Contamination of Austrian corn with *Fusarium* toxins in autumn 1996. *Cereal Research Communications* 25: 359-360.
- Eriksen GS. 2003. Metabolism and toxicity of trichothecenes. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Eriksen GS, Pettersson H. 2004a. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 114: 205-239.
- Eriksen GS, Pettersson H, Lund T. 2004b. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology* 42: 619–624.
- Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection* 64: 1019-1024.
- Eskola M. 2003. Study on trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in Finnish cereals: occurrence and analytical techniques. PhD thesis. University of Helsinki, Helsinki.
- Hazel CM, Patel S. 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* 153: 51–59.
- Etcheverry M, Torres A, Ramirez ML, Chulze S, Magan N. 2002. *In vitro* control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants

under different water availability and temperature regimes. *Journal of Applied Microbiology* 92: 624-632.

Faixová Z, Faix Š, Bořutová R, Leng L. 2007. Efficacy of dietary selenium to counteract toxicity of deoxynivalenol in growing broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno* 76: 349-356.

Farnochi MC, Torres ASM, Magan N, Chulze SN. 2005. Effect of antioxidants and mycoflora on *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* populations and fumonisins production on maize grain. *Journal of Stored Products Research* 41: 211-219.

Flaherty JE, Pirttilä AM, Bluhm BH, Woloshuk CP. 2003. *PAC1*, a pH-Regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5222-5227.

Franceschi S, Bidoli E, Baron AE, LaVecchia C. 1990. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. *Journal of National Cancer Institute* 82: 1407-1411.

Garcia R, Alves ESS, Santos MP, Viégas Aquije GMF, Fernandes AAR, dos Santos RB, Ventura JA, Fernandes PMB. 2008. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:163-168.

Gelderblom WCA, Cawood ME, Snyman SD, Vlegaar R, Marasas WFO. 1993. Structure-function activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology* 31: 407-414.

Ghosh S, Bhattacharyya DK. 1997. Medium-chain fatty acid-rich glycerides by chemical and lipase-catalyzed polyester-monoester interchange reaction. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74: 593-595.

Gill AO, Delaquis P, Russo P, Holley RA. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73: 83-92.

Giridhar P, Reddy SM. 2001. Phenolic antioxidants for control of some mycotoxigenic fungi. *Journal of Food Science and Technology* 38: 397-399.

Glenn AE. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 137: 213-240.

Gunstone ED, Harwood JL, Padley FB. 1994. *The Lipid Handbook*. Chapman and Hall, London.

Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124: 91-97

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990.

- Hajjaj H, Klaébé A, Goma G, Blanc PJ, Barbier E, François J. 2000. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1120-1125.
- Hatton PV, Kinderlerer JL. 1991. Toxicity of medium chain fatty acids to *Penicillium crustosum* Thom. and their detoxification to methyl ketones. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 401-407.
- Hazel CM, Patel S. 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* 153: 51–59.
- Hayes JD, Pulford DJ, Ellis EM, McLeod R, James RFL, Seidegard J, Mosialou E, Jernström B, Neal GE. 1998. Regulation of rat glutathione S-transferase A5 by cancer chemopreventive agents: Mechanisms of inducible resistance to aflatoxin B1. *Chemico-Biological Interactions* 111–112: 51–67.
- Herath H, Abeywickrama K. 2008. *In vitro* application of selected essential oils and their major components in controlling fungal pathogens of crown rot in Embul banana (*Musa acuminata* – AAB). *International Journal of Food Science and Technology* 43: 440–447.
- Hussein HS, Brasel JM. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101-134.
- IARC, 1993. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances. Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56: 397–444. Lyon, France.
- Iten F, Saller R, Abelz G, Reichling J. 2009. Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris* –chemotype carvacrol. *Planta Medica*, in press.
- Iverson F. 1999. *In vivo* studies on butylated hydroxyanisole. *Food and Chemical Toxicology* 37: 993-997.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005. Modern Food Microbiology. Springer Science & Business Media Inc.
- Jayashree T, Subramanyam C. 1999. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology* 28: 179–183.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants. 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food additives Series, No. 47, Geneva.
- Jouany JP. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology* 137: 342-362.

- Juglal S, Govinden R, Odhav B. 2002. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of Food Protection* 65: 683-687.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 626-631.
- Kabak B, Dobson ADW, Var I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46: 593-619.
- Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. 1972. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2: 23-28.
- Kabara JJ, Marshall DI. 2005. Antimicrobials in food. Medium-chain fatty acids and esters. Taylor & Francis.
- Kahl R., Weinke S, Kappus H. 1989. Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole. *Toxicology* 59: 179-194.
- Kimura M, Takahashi-Ando N, Nishiuchi T, Ohsato S, Tokai T, Ochiai N, Fujimura M, Kudo T, Hamamoto H, Yamaguchi I. 2006. Molecular biology and biotechnology for reduction of *Fusarium* mycotoxin contamination. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86: 117–123.
- Konstantopoulou I, Vassilopoulou L, Mavragani-Tsipidou P, Scouras ZG, 1992. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. *Experientia* 48: 616–619.
- Kosalec I, Pepeljnjak S. 2004. Najznačajniji mikotoksini i mikotoksikoze. *Praxis Veterinaria* 52: 169-181.
- Kouadio JH, Théophile AM, Baudrimont I, Moukha S, Dano SD, Creppy EE. 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* 213: 56–65.
- Krska R, Welzig E, Boudra H. 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137: 241-264.
- Kurita N, Koike S. 1983. Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components. *Agricultural Biology and Chemistry* 47: 67-75.
- Lanciotti R, Belletti N, Patrignani F, Gianotti A, Gardini F, Guerzoni ME. 2003. Application of hexanal, (E)-2-hexanal, and hexyl acetate to improve the safety of fresh-sliced-apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2958–2963.
- Lee HB, Magan N. 2000. Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 61:11–16.



- Lin CCS, Fung DYC. 1983. Effect of BHA, BHT, TBHQ and PG on growth and toxigenesis of selected *Aspergilli*. *Journal of Food Science and Technology* 48: 576-580.
- Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Bottalico A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 597-609
- Logrieco A, Bottalico A, Mulé G, Moretti A, Perrone G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins from some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109: 645-670.
- Lopez AG, Theumer MG, Zygadlo JA, Rubinstein HR. 2004. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* fumonisin B<sub>1</sub> production in corn grain. *Mycopathologia* 158: 343-349.
- López-Malo A, Alzamora SM, Palou E. 2002. *Aspergillus flavus* dose–response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology* 73: 213– 218.
- López-Malo A, Alzamora SM, Palou E. 2002. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology* 99:119– 128.
- Magan N, Hope R, Colleate A, Baxter ES. 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108: 685–690.
- Magan N, Hope R, Cairns V, Aldred D. 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* 109: 723-730.
- Magan N, Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119: 131-139.
- Mannion PF, Blaney BJ. 1988. Responses of meat chickens offered 4-deoxynivalenol and zearalenone containing wheat, naturally infected with *Fusarium graminearum*. *Australian Journal of Agricultural Research* 39: 533–540.
- Marasas WFO. 1995. Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural Toxins* 3: 193-198.
- Marin S, Sanchis V, Vinas I, Canela R, Magan N. 1995a. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B<sub>1</sub>, and B<sub>2</sub> production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Letters in Applied Microbiology* 21: 298-301.

- Marin S, Sanchis V, Magan N. 1995b. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Canadian Journal of Microbiology* 41:1063–1070.
- Marin S, Sanchis V, Teixido A, Saenz R, Ramos AJ, Vinas I, Magan N. 1996. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* from maize. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1045–1050.
- Marin S, Sanchis V, Ramos AJ, Vinas I, Magan N. 1998a. Environmental factors, *in vitro* interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research* 102: 831-837.
- Marin S, Companys E, Sanchis V, Ramos AJ. 1998b. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycological Research* 120: 959-964.
- Marin S, Sanchis V, Ramos AJ, Magan N. 1998c. Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* during colonisation of maize. *International Journal of Food Microbiology* 42: 185–194.
- Marin S, Sanchis V, Arnau F, Ramosa AJ, Magan N. 1998d. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 45: 107–117.
- Marín S, Magan N, Abellana M, Canela R, Ramos AJ, Sanchis V. 2000. Selective effect of propionates and water activity on maize mycoflora and impact on fumonisin B1 accumulation. *Journal of Stored Products Research* 36: 203-214.
- Marin S, Velluti AS, Muñoz A, Ramos AJ, Sanchis V. 2003. Control of fumonisin B1 accumulation in naturally contaminated maize inoculated with *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*, by cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa essential oils. *European Food Research and Technology* 217: 332-337.
- Marin S, Velluti A, Ramos AJ, Sanchis V. 2004. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. *Food Microbiology* 21: 313-318.
- McMullen M, Jones R, Gallenberg D. 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81:1340-1348.
- Missmer S.A, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill A.H.Jr., Rothman K. J, Hendricks K.A. 2006. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environmental Health Perspectives* 114: 237-241.

- Miguel MG, Falcato-Simões M, Figueiredo AC, Barroso JMG, Pedro LG, Carvalho LM. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *Journal of Food Lipids* 12: 181-197.
- Moleyar V, Narasimham P. 1986. Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology* 3: 331-336.
- Morgavi DP, Riley RT. 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* 137: 201-212.
- Mourey A, Canillac N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13: 289–292.
- Munkvold GP. 2003. Epidemiology of *Fusarium* disease and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705-713.
- Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM. 2006. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science* 71: 51-65.
- Narodne novine. 1998. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva: *Pravilnik o kakvoći stočne hrane* br. 26/98. Službeni list Republike Hrvatske.
- Narodne novine. 2007. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva: *Pravilnik o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje* br. 118/2007. Službeni list Republike Hrvatske.
- Nesci A, Rodriguez M, Etcheverry M. 2003. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. *Journal of Applied Microbiology* 95: 279-287.
- Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F, Blanco AR. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 56: 519–523.
- Official Journal of the European Communities. 1999. Commission Decision of 23 February 1999 adopting a register of flavouring substances used in or on foodstuffs drawn up in application of Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council of 28 October 1996. Official Journal 217: 1–137.
- Official Journal of the European Communities. 2002. Commission Decision of 23 January 2002 amending Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. 2002/113/EC. Official Journal 32: 1–160.

Official Journal of the European Communities. 2004. Update of the list of the authorised additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. Official Journal 50: 1–168.

Official Journal of the European Union, 2005. Commission regulation (EC) No 856/2005 of 6 June 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards *Fusarium* toxins. Official Journal 856: 3-8.

Official Journal of the European Union, 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal 576, 7-9.

Official Journal of the European Union, 2007. Commission regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. Official Journal 1126: 14-17.

Osborne LE, Stein JM. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119: 103-108.

Oswiler GD. 2000. Mycotoxins - Contemporary issues of food animal health and productivity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 16: 511-530.

Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJ-P, Bégin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acid and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37: 155-162.

Ožegović L, Pepeljnjak S. 1995. Mikotoksikoze, Školska knjiga, Zagreb.

Pandey R, Kalra, A, Tandon, S, Mehrotra N, Singh HN, Kumar S. 2000. Essential oil compounds as potent source of nematicidal compounds. *Journal of Phytopathology* 148: 501-502.

Passone MA, Resnik S, Etcheverry MG. 2007. Antiaflatoxic property of food grade antioxidants under different conditions of water activity in peanut grains. *International Journal of Food Microbiology* 118: 8–14.

Passone MA, Resnik S, Etcheverry MG. 2008. The potential of food grade antioxidants in the control of *Aspergillus* section *Flavi*, interrelated mycoflora and aflatoxin B1 accumulation on peanut grains. *Food Control* 19: 364-371.

Paster N, Juven BJ, Shaaya E, Menasherov M, Nitzan R, Weisslowicz H, Ravid U. 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 11: 33-37.

- Pateraki M, Dekanea A, Mitchell D, Lydakis D, Magan N. 2007. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on *in vitro* germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Postharvest Biology and Technology* 44: 141–149.
- Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Brlek V. 1999. Skladišne gljivice i mikotoksini u našim skladištima. Zbornik radova ZUPP seminara o ekološki prihvatljivoj zaštiti uskladištenih žitarica, Korunić d.o.o., Zagreb: 51-64.
- Pestka JJ, Zhou H-R, Moon Y, Chung YC. 2004. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicology Letters* 153: 61–73.
- Pestka JJ. 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137: 283-298.
- Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Pinto E, Costa-de Oliviera S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Martinez-de-Oliveira J. 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *European Academy of Dermatology and Venereology* 18: 73–78.
- Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 55: 1367–1373.
- Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37.
- Prelusky DB, Hamilton RM, Trenholm HI, Miller JD. 1986. Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of <sup>14</sup>C-labeled deoxynivalenol to White Leghorn hens. *Fundamental and Applied Toxicology* 7: 635-645.
- Ramirez ML, Chulze S, Magan N. 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* 23:17–125.
- Ramirez ML, Chulze S, Magan N. 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology* 106: 291-296.
- Reynoso M, Torres AM, Ramirez ML, Rodriguez MI, Chulze SN, Magan N. 2002. Efficacy of antioxidant mixtures on growth, fumonisin production and hydrolytic enzyme production

by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* *in vitro* on maize-based media. *Mycological Research* 106: 1093-1099.

Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2101-2105

Riháková Z, Filip V, Plocková M, Šmidrkal J, Červenková R. 2002. Inhibition of *Aspergillus niger* DMF 0801 by monoacylglycerols prepared from coconut oil. *Czech Journal of Food Science* 20: 48-52.

Rocha O, Ansari K, Doohan FM. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 22: 369–378.

Roinestad KS, Montville TJ, Rosen JD. 1993. Inhibition of trichothecene biosynthesis in *Fusarium tricinctum* by sodium bicarbonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 2344-2346.

Roinestad KS, Montville TJ, Rosen JD. 1994. Mechanism for sodium bicarbonate inhibition of trichothecene biosynthesis in *Fusarium tricinctum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2025-2028.

Romer Labs. Clean-up for type A and B trichothecenes. Romer Labs Diagnostics GmbH.

Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. 1996a. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48: 1-31.

Rotter BA, Thompson BK, Prelusky DB, Trenholm HL, Stewart B, Miller JD, Savard ME. 1996b. Response of growing swine to dietary exposure to pure fumonisin B1 during an eight-week period: growth and clinical parameters. *Natural Toxins* 4: 42-50.

Ruberto G, Baratta MT. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69: 167-174.

Russell AD. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology* 71: 191-201.

Salobir J, Frankič T. 2007. Antioksidanti-važnost za žvotinje i potrošače. XV međunarodno savjetovanje- Krmiva, Opatija 2-5 lipnja. Zbornik sažetaka: 13.

Samapundo S, Devlieghere F, De Meulenaer B, Geeraerd AH, Van Impe JF, Debevere JM. 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology* 105: 35-52.

Schlatter J. 2004. Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicology Letters* 153: 83–89.

- Selvi A. T, Joseph G.S, Jayaprakasha G. K. 2003. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiology* 20: 455–460.
- Shephard GS, Thiel PG, Stockenström S, Sydenham EW, 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 79: 671-687
- Shepard GS, Marasas WF, Leggott NL, Yazzdanpanah H, Rahimian H, Safavi N. 2000. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 1860-1864.
- Shier WT, Abbas HK, Mirocha CJ. 1991. Toxicity of the mycotoxins fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> and *Alternaria alternata* f. sp. lycopersici toxin (AAL) in cultured mammalian cells. *Mycopathologia* 116: 97–104.
- Sikkema J, De Bont J. Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Review* 59: 201–222.
- Simonetti G, Simonetti N, Villa A. 2003. Increase of activity of tioconazole against resistant microorganisms by the addition of butylated hydroxyanisole. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22: 439- 443.
- Skřivanová E, Marounek M, Dlouhá G, Kaňka J. 2005. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2–C18 fatty acids. *Letters in Applied Microbiology* 41: 77–81.
- Soriano JM, Dragacci S. 2004. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. *Food Resaerch International* 37: 367-374.
- Song J, Hildebrand PD, Fan L, Forney CF, Renderos WE, Campell-Palmer L, Doucette C. 2007. Effect of hexanal vapor on the growth of postharvest pathogens and fruit decay. *Journal of Food Science* 72: 108-112.
- Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. 2005. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology* 43: 985–1015.
- Slamenová D, Horváthová E, Wsóllová I, Sramková M, Navarová J. 2009. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutation Research* 677: 46–52.
- Spricigo CB, Pinto LT, Bolzan A, Novais AF. 1999. Extraction of essential oil and lipids from nutmeg by liquid carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 15: 253-259.

Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi HL, Wright A. 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology* 37: 813-823.

Svircev AM, Smith RJ, Zhou T, Hernandez M, Liu W, Chu, CL. 2007. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biology and Technology* 45: 228–233.

Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WFO, Shepard GS, Schalkwyk DJ, Koch KR. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of Transkei, Southern Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1900-1903.

Sypecka Z, Kelly M, Brereton P. 2004. Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5463-5471.

Thompson DP, Moldéus P. 1988. Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 37: 2201-2207.

Thompson DP. 1992. Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia* 84: 791-793.

Thompson DP, Metevia L, Vessel T. 1993. Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *Journal of Food Protection* 56: 134-138.

Thompson DP. 1994. Minimum inhibitory concentration of esters of p-hydroxybenzoic acid (paraben) combinations against toxigenic fungi. *Journal of Food Protection* 57: 133-135.

Thompson DP. 1996. Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection* 59: 412-415.

Thormar H, Isaacs CE, Brown HR, Barshatzky MR, Pessolano T. 1987. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31: 27-31.

Thoroski J, Blank G, Biliaderis C. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52: 399–403.

Trang TTN, Casabianca H, Grenier-Loustalot MF. 2006. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386: 2141–2152.



- Tomasović S, Vlahović V, Matijašević M, Sesar B. 1991. Oplemenjivanje pšenice na otpornost prema fuzariozama klasa (palež klasa). *Sjemenarstvo* 2: 67-76.
- Torres AM, Ramirez ML, Arroyo M, Chulze SN, Magan N. 2003. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisins production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 83: 319-324.
- Torres MR, Ramos AJ, Soler J, Sanchis V, Marin S. 2003. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 81: 185– 193
- Turner PC, Nikiema P, Wild CP. 1999. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research* 443: 81-93.
- Ueno J, Iijima K, Wang S-D, Sugiura Y, Sekijima M, Tanaka T, Chen C, Yu S-Z. 1997. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food and Chemical Toxicology* 35: 1143-1150.
- Ultee A, Smid EJ. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 64: 373–378.
- Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1561–1568.
- Utto W, Mawson AJ, Bronlund JE. 2008. Hexanal reduces infection of tomatoes by *Botrytis cinerea* whilst maintaining quality. *Postharvest Biology and Technology* 47: 434–437.
- Velluti A, Marin S, Gonzales R, Ramos AJ, Sanchis V. 2000a. Fumonisin B1, zearalenon and deoxynivalenol production by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in mixed cultures on irradiated maize kernels. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 88-94.
- Velluti A, Marrin S, Bettucci L, Ramos AJ, Sanchis V. 2000b. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology* 59: 59–66.
- Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ, Egido J, Marin S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa essential oils on growth and fumonisin B1

production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 89: 145-154.

Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ, Marin S. 2004a. Effect of essential oils of cinnamon, clove, lemon grass, oregano and palmarosa on growth of and fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium verticillioides* in maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 1141-1146.

Velluti A, Marin S, Gonzales P, Ramos AJ, Sanchis V. 2004b. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology* 21: 649-656.

Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ, Turon C, Marin S. 2004c. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *Journal of Applied Microbiology* 96: 716–724.

Vicam L. P. 2004. FumoniTest HPLC, Instruction Manual. Watertown, MA, USA.

Vicam L. P. 2005. DONtest HPLC Instruction Manual. Watertown, MA, USA.

Vigier B, Reid LM, Dweyer LM, Stewart DW, Sinha RC, Arnason JT, Butler G. 2001. Maize resistance to giberella ear rot: symptoms, deoxynivalenol, and yield. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 99-105.

Visconti A. 2001. Problems associated with *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University* 9: 39-55.

Voss KA, Smith GW, Haschek WM. 2007. Fumonisin: toxicokinetics, mechanisms of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology* 137: 299-325.

Walters DR, Walker RL, Walker KC. 2003. Lauric acid exhibits antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Phytopathology* 151: 228–230.

Wang H, Hwang SF, Eudes F, Chang KF, Howard RJ, Turnbull GD. 2006. Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant Pathology* 55: 224-230.

Warfield CY, Gilchrist DG. 1999. Influence of kernel age on fumonisin B<sub>1</sub> production in maize by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2853-2856.

WHO, World Health Organization 1990. Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. Environmental Health Criteria 105, Geneva, Švicarska.

Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. 1999. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology* 37: 1027-1038.

- Wright MS, Greene-McDowelle DM1, Zeringue Jr. HJ, Bhatnagar D, Cleveland TE. 2000. Effects of volatile aldehydes from *Aspergillus*-resistant varieties of corn on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin biosynthesis. *Toxicon* 38: 1215-1223.
- Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry* 64: 59-66.
- Yiannikouris AJ, Jouany P. 2002. Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51: 81-99.
- Yin JJ; Smith MJ, Eppley RM; Page SW; Sphon J A. 1998. Effects of fumonisin B-1 on lipid peroxidation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1371: 134-142.
- Yuen GY, Schoneweis SD. 2007. Strategies for managing *Fusarium* head light and deoxynivalenol accumulation in wheat. *International Journal of Food Microbiology* 119: 126-130.

## **8. PRILOZI**

## Popis kratica

3-AcDON	3-acetildeoksinivalenol
15-AcDON	15-acetildeoksinivalenol
aw	aktivitet vode
BHA	butilirani hidroksianisol
BHT	butilirani hidroksitoluen
C	citral
C8	oktanska kiselina
C8Na	natrij-oktanoat
C10	dekanska kiselina
C12	dodekanska kiselina
C14	tetradekanska kiselina
D	decenal
DON	deoksinivalenol
E	etoksikvin
EUG	eugenol
FB1	fumonizin B1
FB2	fumonizin B2
H	heksenal
HACCP	hazard analysis and critical control point system
HPLC	high performance liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants
K	karvakrol
P	pentenal
PDA	potato dextrose agar
PG	propil galat
PP	propil paraben
PPT-2	krmna smjesa PPT-2
SK-D-N	krmna smjesa SK-D-N
SPE	solid phase extraction
T	timol
TBHQ	tert-butilhidrokinon
THBP	trihidroksibutirofenon
NIV	nivalenol
ZEN	zearalenon
WHO	World Health Organisation

## **9. ŽIVOTOPIS**

Gabriella Kanižai Šarić rođena je 30. prosinca 1974. godine u Osijeku. Osnovnu i srednju školu završila je u Osijeku. Diplomirala je na Poljoprivrednom fakultetu, ratarski smjer, 2000. godine. Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij „Zaštita prirode i okoliša“ upisala je u lipnju 2006. godine.

Pristupnica je zaposlena na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku, pri Katedri za mikrobiologiju i zemljišne resurse, kao znanstveni novak - asistent na znanstvenim projektima: “Učinkovitost simbioze između *Galega orientalis* Lam. i *Rhizobium galegae*” i “Uzgoj *Galega orientalis* - nove krmne leguminoze u Hrvatskoj“ voditeljice prof. dr. sc. Zlate Milaković, od 01. veljače 2005. godine. Također, bila je suradnica i na tehnološkom projektu „Recepture krmiva otpornijih na rast plijesni i sintezu mikotoksina“ voditelja prof. dr. sc. Tomislava Klapca.

Sudjeluje u izvođenju vježbi iz predmeta: „Opća mikrobiologija“ i „Osnove pedologije i mikrobiologije na preddiplomskom studiju, kao i na modulima diplomskog studija „Mikroorganizmi i biljke“, „Mikroorganizmi u ekološkoj proizvodnji“ i „Mikrobiologija tla“.

U okviru stručnog usavršavanja boravila je na Hohenheimskom sveučilištu u Stuttgartu, Njemačka, u periodu od 10. siječnja do 07. veljače 2006. godine. Sudjelovala je na tečaju „DNA i RNA“ u sklopu obrazovnog projekta "Metodološki tečajevi u biologiji i medicini" u organizaciji Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, od 20-24. travnja 2009. godine

Pristupnica je autor i koautor šest znanstvenih radova indeksiranih u Current Contents bazi podataka, dva znanstvena rada indeksirana u CAB bazi podataka te je aktivno sudjelovala na brojnim međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima.

Članica je Hrvatskog društva agronoma.