

INHIBICIJA RASTA *FUSARIUM* SP. U STOČNOJ HRANI

Gabriella Kanižai Šarić ⁽¹⁾, T. Klapac ⁽²⁾, Zlata Milaković ⁽¹⁾, B. Šarkanj ⁽²⁾, H. Pavlović ⁽²⁾

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

Kontaminacija gljivama iz roda *Fusarium*, osim na usjevima u polju, može se pojaviti i u uskladištenim proizvodima. Stoga se stočnoj hrani pohranjenoj u skladišta i silose dodaju tvari antifungalnih osobina. U ovome radu ispitana je djelotvornost smjese sintetskih i prirodnih antioksidanasa na rast *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioides* u krmnoj smjesi. Najučinkovitija inhibicija rasta ostvarena je smjesom butiliranoga hidroksianisola, propil parabena i timola.

Ključne riječi: *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, krmna smjesa, antioksidansi

UVOD

Fusarium vrste, identificirane u sedmogodišnjem praćenju (1996.-2002.) toga patogenoga roda na području istočne Hrvatske, uključuju *Fusarium graminearum* Schw. kao dominantnu vrstu izoliranu sa zrna, korijena i stabljike pšenice, dok su se ostale vrste javile u znatno manjem postotku: *Fusarium verticillioides* Sacc., *Fusarium subglutinans* (Wollenw. i Reink.) Nelson, Toussoun i Marasas, *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *Fusarium poae* (Peck) Wollenw., *Fusarium oxysporum* Schlecht emend. Snyder i Hans., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Fusarium sporotrichioides* Sherb., *Microdochium nivale* (Fries) Samuels i Hallett (Čosić i sur., 2004.). Sličnim je monitoringom utvrđeno 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. oxysporum* i *F. sporotrichioides* (Čosić i sur., 1999.; Čosić i sur., 2004.; Cvetnić i sur., 2005.). Iako se taj rod često klasificira u plijesni polja zbog njihove potrebe za većom vlažnosti supstrata i povećanom vlagom zraka, postoji realna opasnost od kontaminacije uskladištenih žitarica tim fitopatogenom. U cilju prevencije rasta tih patogena, stočnoj se hrani mogu dodavati antioksidansi i eterična ulja. Utvrđeno je kako fenolni sintetski antioksidansi, poput butiliranoga hidroksianisola i propil parabena, imaju fungitoksičan učinak (Ahmand i sur., 1981.; Lin i sur., 1983.; Nesci i sur., 2003.). Također, dokazana su antifungalna svojstva eteričnih ulja (Moleyar i sur., 1986.; Akgül i sur., 1988.; Arras i sur., 2001.; Elgayyar i sur., 2001.; Daferera i sur., 2003.). Pojedini sastojci

eteričnih ulja, poput timola, također pokazuju antifungalnu aktivnost (Pina-Vaz i sur., 2004.; Pinto i sur., 2006.). Istraživanja Reynoso i sur. (2002.) i Passone i sur. (2007.) pokazala su da primjena mješavine antioksidansa može biti učinkovitija od pojedinačne primjene, zbog različitoga djelovanja primijenjenih tvari na rast i razvoj fungalne stanice. S obzirom na činjenicu da su *F. graminearum* i *F. verticillioides* česti patogeni žitarica i uskladištenih proizvoda u Republici Hrvatskoj, u ovom je istraživanju ispitan utjecaj smjese fenolnih antioksidanasa butiliranoga hidroksianisola, propil parabena i timola na radikalni rast navedenih patogena u gotovoj krmnoj smjesi.

MATERIJAL I METODE

Kao supstrat korištena je krmna smjesa PPT-2 (za tov pilića u porastu), koja je sterilizirana gama zrakama od 12 kGrya. Glavni sastojci te krmne smjese su kukuruz, tostirana soja i sojina sačma. Željeni aktivitet vode (0,95) podešen je prema krivulji adsorpcije vlage, koji je provjeravan uređajem za mjerenje aktiviteta vode (HygroPalm AW1, Rotronic). U pokusima su korištene čiste kulture: *F. graminearum* 110250 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska) i *F. verticillioides* M-1325 (Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, Penn State University, SAD). Čiste su kulture uzgojene u petrijevim zdjelicama na krompir-dekstroznom agaru (potato dextrose agar, BioLife)

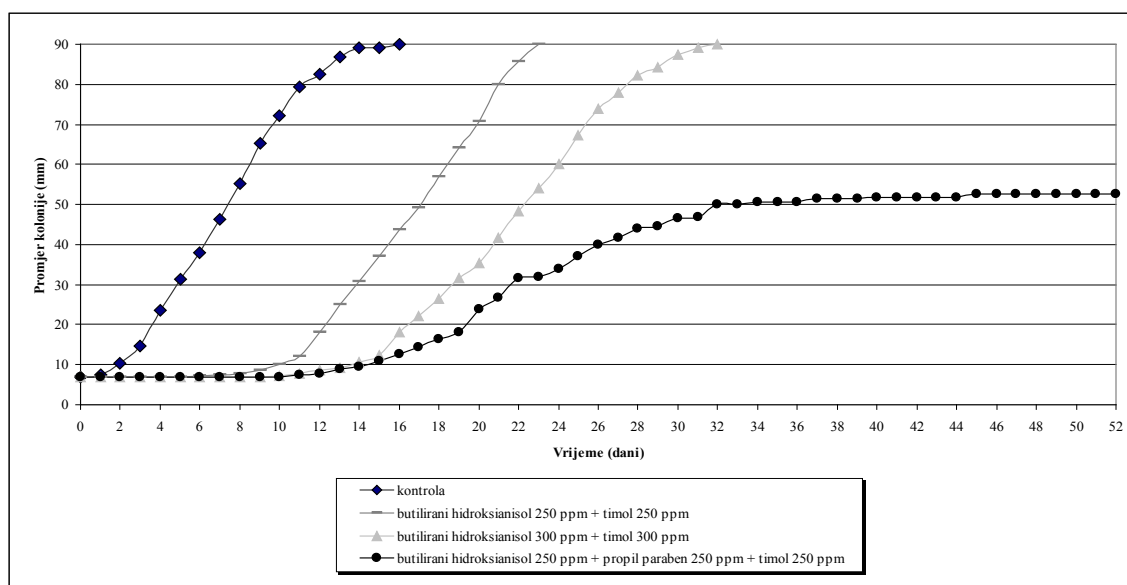
(1) Doc.dr.sc. Gabriella Kanižai Šarić (gkanizai@pfos.hr), prof.dr.sc. Zlata Milaković - Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, 31000 Osijek, R. Hrvatska, (2) Prof.dr.sc. Tomislav Klapac, doc.dr.sc. Hrvoje Pavlović, Bojan Šarkanj, dipl. ing. - Prehrambeno-tehnološki fakultet, F. Kuhača 20, 31000 Osijek, R. Hrvatska

tijekom pet dana. Ispitani antifungalni agensi obuhvatili su smjesu butiliranoga hidroksianisola i timola po 250 ppm, zatim 300 ppm butiliranoga hidroksianisola s timolom i po 250 ppm navedenih tvari s propil parabenom. Kontrolne su probe sadržavale sterilnu vodu umiješanu u krmnu smjesu. Ispitivane su tvari odvagane u sterilnim uvjetima i otopljene u deioniziranoj vodi, 95% alkoholu i 10% Tweenu 80 (9:2:2, v/v/v). Probe su pohranjene sljedećih 48 h na 4°C, zbog uravnoteženja vlage i antifungalnih mješavina tvari, uz povremeno protresivanje. Nakon uravnoteženja vlage, krmna je smjesa u sterilnim uvjetima razvagana (20 g) u petrijeve zdjelice. Izvršena je inokulacija micelijskim diskom čistih kultura promjera 7 mm. Potom su petrijeve zdjelice stavljene u plastične vrećice koje su sadržavale posudice s otopinom NaCl istog aktiviteta vode kao i krmna smjesa, kako bi se u okruženju unutar vrećice osigurala konstantna relativna vlažnost. Kontrolna krmiva i krmiva s određenom kombinacijom tvari naciepljena su u tri ponavljanja. Petrijeve su ploče inkubirane na 25°C ± 0,2°C u jednome režimu svjetlosti (24 sata tama) u termostatskome kabinetu. Svakodnevno je praćen porast plijesni na krmnoj smjesi mjerenjem dva promjera kolonije pod pravim kutom, dok kolonija nije dosegla rub petrijeve zdjelice. Fungalni je porast korišten za računanje stope rasta primjenom linearne regresije. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnov testom. Skupovi podataka testirani su Studentovim t-testom. Za statističku analizu podataka korišteni su programski sustavi Excel 2003 (Microsoft) i Statistica 7.0 (StatSoft).

REZULTATI I RASPRAVA

Temeljem preliminarnih ispitivanja, butilirani hidroksianisol odabran je kao stalni sastojak antifungalnih kombinacija zbog inhibitornog učinka na rast *Fusarium* vrsta, koji su primijetili i drugi istraživači. Thompson (1992.) je utvrdio inhibiciju rasta *F. gra-*

minearum na umjetnoj hranjivoj podlozi pri 250 ppm butiliranoga hidroksianisola. Redukcija micelijskoga rasta *Fusariuma* sp. pri aw 0,95 utvrđena je s 500 ppm butiliranoga hidroksianisola, na sterilnome zrnu kukuruza (Torres i sur., 2003.), a značajna inhibicija rasta *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium* zabilježena je tretmanom s 1000 ppm butiliranoga hidroksianisola pri aw 0,95 na nesteriliziranome zrnu kukuruza (Farnochi i sur., 2005.). Kombinacije ispitivanih tvari butiliranoga hidroksianisola s timolom (Slika 1.) prouzročile su 5-7 dana dužu lag fazu rasta *F. graminearum*, u odnosu na kontrolu. Lag faza (faza suzdržanoga rasta) je razdoblje u kojemu se stanica priprema na rast u okolišu u kojem se nalazi te sintetizira RNA, enzime i druge molekule. Uočeno produženje lag faze nastaje zbog poremećaja koje primijenjene antifungalne tvari izazivaju, što su utvrdili i drugi istraživači (Etcheverry i sur. 2002.; Torres i sur., 2003.; Passone i sur., 2005.). Ispitane smjese tvari nisu učinkovite zbog nedovoljne primijenjene koncentracije, koje su iznosile 500 do 600 ppm ukupne koncentracije. Naime, prirodni supstrati zahtijevaju veće koncentracije u inhibiciji rasta plijesni, u usporedbi s umjetnim hranjivim podlogama, što su zaključili i Torres i sur. (2003.). Smjesa antifungalnih tvari butiliranoga hidroksianisola, timola i propil parabena najučinkovitija je i utvrđena je statistički značajna razlika (Tablica 1.) u inhibiciji rasta *F. graminearum*, u usporedbi s kontrolom ($p < 0,05$). Ta je kombinacija reducirala rast *F. graminearum* za 79%, uz izazivanje stagnacije rasta u dva od tri ponavljanja pokusa. Sve tri tvari u ispitivanoj smjesi oštećuju staničnu membranu. Pojačano istjecanje šećera, aminokiselina i proteina iz fungalne stanice *Fusarium* sp. tretirane s butiliranim hidroksianisolom utvrdio je Thompson (1996.), dok timol prouzrokuje dezorganizaciju staničnih organela fungalnih konidija i gubitak stanične strukture i organizacije (Svircev i sur., 2007.).



Slika 1. Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom različitim kombinacijama tvari
Figure 1. Daily growth of *Fusarium graminearum* in fodder mixtures PPT-2 treated with different mixtures

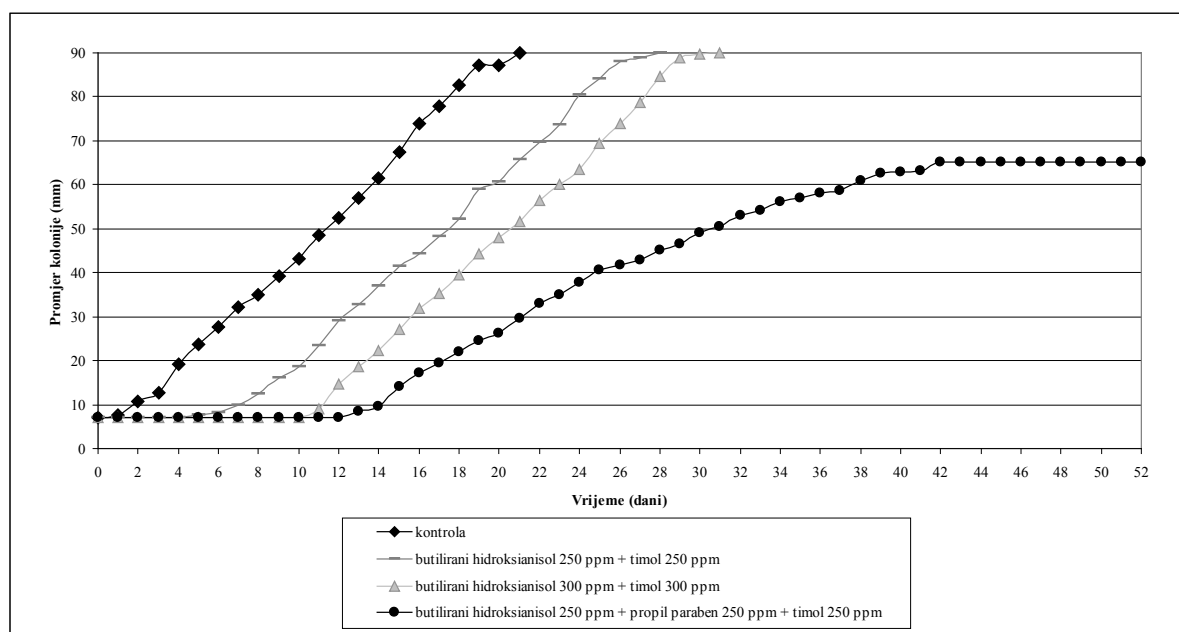
Tablica 1. Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum*Table 1. Influence of antifungal combinations and concentrations on the growth of *Fusarium graminearum*

Kombinacije antifungalnih tvari	Koncentracija (ppm)	Lag faza (dani)	Stopa rasta (mm/dan)
Kontrola		3	5,6
Butilirani hidroksianisol + timol	250 + 250	10	3,8
Butilirani hidroksianisol + timol	300 + 300	14	3,0
Butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	250 + 250 + 250	14	1,4*

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

Inhibicija rasta *F. verticillioides* na krmivu PPT-2 pri aw 0,95 uz smjesu butiliranoga hidroksianisola i timola po 250 i 300 ppm prouzročile su 3-5 dana dužu lag fazu (Slika 2.). Te kombinacije pokazuju određeno inhibitorno djelovanje u odnosu na kontrolu, ali redukcija rasta *F. verticillioides* s ukupnim primijenjenim koncentracijama 500 i 600 ppm nije dovoljna na prirodnome supstratu kao što je krmna smjesa. Slična su zapažanja primijetili 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 njihovoga djelovanja na stanice mikroorganizama koje se nalaze u hidrofilnom okruženju. Isti autori pretpostavljaju kako veća pristupačnost nutrijenata u hrani, u

usporedbi s umjetnim hranjivim podlogama, omogućuje mikroorganizmima i brži oporavak stanica. Kombinacija butiliranoga hidroksianisola, timola i propil parabena u ukupnoj koncentraciji od 750 ppm, reducira rast *F. verticillioides* za 60%, uz sedam puta dužu lag fazu u odnosu na kontrolu, što je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) (Tablica 2.). Osim toga, te antifungalne tvari izazvale su i stagnaciju u rastu plijesni, što znači da su nakon određenoga perioda rasta onemogućile daljnju diobu istraživanog *Fusarium* vrste. Stagnacija rasta najvjerojatnije je nastala kao posljedica oksidativnoga stresa izazvanoga visokim dozama fenola, pri čemu su reaktivne vrste kisika prouzročile oštećenja lipida, proteina i DNA (Iverson, 1999.; Atsumi i sur., 2005.).

**Slika 2. Dnevni rast *Fusarium verticillioides* na krmivu PPT-2 tretiranom različitim kombinacijama tvari**Figure 2. Daily growth of *Fusarium verticillioides* in fodder mixtures PPT-2 treated with different mixtures

Tablica 2. Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium verticillioides*Table 2. Influence of antifungal combinations and concentrations on the growth of *Fusarium verticillioides*

Kombinacije antifungalnih tvari	Koncentracija (ppm)	Lag faza (dani)	Stopa rasta (mm/dan)
Kontrola		2	4,3
Butilirani hidroksianisol + timol	250 + 250	7	3,5
Butilirani hidroksianisol + timol	300 + 300	11	3,1
Butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	250 + 250 + 250	14	1,7 ^{*a}

* stopa rasta značajno niža od kontrole, $p < 0,05$; ^a stagnacija rasta nakon 65 mm

Mehanizam djelovanja antioksidanasa koji inhibiraju rast micelija toksikogenih gljiva nije jasan (Aldred i sur., 2008.). Lipofilni butilirani hidroksianisol i timol 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.). Osim oštećenja stanične membrane fenolnim spojevima, visoke koncentracije antioksidanasa mogu dovesti do oksidativnoga 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.; Slamenová i sur., 2009.).

Korištenje sintetskih antioksidanasa u nekim je zemljama zabranjeno, zbog nepoželjnih efekata na zdravlje (Miguel i sur., 2005.), te je potrebno u stočnoj hrani smanjiti njihove koncentracije ili ih u potpunosti izostaviti i zamijeniti ih prirodnim antioksidansima. S druge strane, neka istraživanja o sigurnosti upotrebe sintetskih antioksidanasa, poput butiliranoga hidroksianisola, pokazala su da njihova primjena u dopuštenim koncentracijama ne predstavlja opasnost za zdravlje. Štoviše, istraživanja na pokusnim životinjama utvrdila su da te tvari u koncentracijama od 100 ppm pokazuju antikancerogene osobine (Williams i sur., 1999.).

Pravilnik o dodacima hrani za životinje (Narodne novine Republike Hrvatske br. 7/2007.) poziva se na Popis odobrenih dodataka hrani za životinje Europske unije, koji je revidiran u listopadu 2011. godine. Butilirani hidroksianisol dopušten je aditiv, prema tome Pravilniku. Također, krmnim se smjesama mogu dodavati sredstva za poboljšanje okusa prirodnoga podrijetla, a u tu se kategoriju uvrštava timol, kao frakcija eteričnog ulja majčine dušice ili origana. Propil paraben nije više na listi odobrenih aditiva u krmivima.

ZAKLJUČAK

Kombinacija sintetskih (butilirani hidroksianisol i propil paraben) i prirodnih (timol) antioksidanasa najučinkovitija je u supresiji rasta *F. graminearum* i *F. verticillioides* na supstratu krmne smjese PPT-2, uz značajnu

redukciju rasta od 79%, tj. 60%. Kombinacije antifungalnih antioksidanasa ispitane su na sterilnim krmnim smjesama, međutim prirodne supstrate karakterizira mješavina mikroorganizama. Iz toga razloga, daljnja bi istraživanja trebala obuhvatiti interakcije između vrsta na nesteriliziranim krmnim smjesama i ispitati njihov utjecaj na učinkovitost antioksidanasa. Buduća bi istraživanja, također, trebala obuhvatiti prihvatljivost takvih krmiva domaćim životinjama, kao i utjecaj antioksidanasa na kvalitetu proizvoda animalnoga podrijetla.

LITERATURA

- Ahmand, S., Branen, A.L. (1981): Inhibition of mold growth by butylated hydroxyanisole. *Journal of Food Science* 46: 1059–1063.
- Akgül, A., Kivanç, M. (1988): Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 6: 263–268.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253.
- 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.

9. Ćosić, J., Jurković, D., Drezner, G. (1999): *Fusarium* vrste utvrđene na korijenu i vlati pšenice u istočnoj Hrvatskoj. *Poljoprivreda* 5: 7-12.
10. Ćosić, J., Vrandečić, K., Svitlica, B. (2004): *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. *Poljoprivreda* 10: 9-14.
11. Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (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.
12. Eklund, T. (1989): Organic acids and esters. Mechanisms of action of food preservation procedures. Elsevier Applied Science, New York.
13. Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A., Mount, J.R. (2001): Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection* 64: 1019-1024.
14. Etcheverry, M., Torres, A., Ramirez, M.L., 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.
15. Farnochi, M.C., Torres, A., Magan, N., Chulze, N. (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.
16. Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A. (2002): Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73: 83-92.
17. Iverson, F. (1999): *In vivo* studies on butylated hydroxyanisole. *Food and Chemical Toxicology* 37: 993-997.
18. Juven, B.J., 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.
19. Kahl, R., Weinke, S., Kappus, H. (1989): Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole. *Toxicology* 59: 179-194.
20. Khan, S.H., Aked, J., Magan, N., 2001. *In vitro* potential for antioxidant chemicals to control the anthracnose pathogens of bananas, *Colletotrichum musae*. *Plant Pathology* 50: 601-608.
21. Lin, C.C.S., Fung, D.Y.C. (1983): Effect of BHA, BHT, TBHQ and PG on growth and toxigenesis of selected *Aspergilli*. *Journal of Food Science and Technology* 48: 576-580.
22. Miguel, M.G., Falcato-Simões, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.M.G., Pedro, L.G., Carvalho, L.M. (2005): Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *Journal of Food Lipids* 12: 181-197.
23. Moleyar, V., Narasimham, P. (1986): Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology* 3: 331-336.
24. Narodne novine. 2007. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva: *Pravilnik o dodaci- ma hrani za životinje* br. 9/2007. Službeni list Republike Hrvatske.
25. 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.
26. Official Journal of the European Communities. 2003. Community Register of Feed Additives. Official Journal: 1831, Edition 126, List of additives – 26.10.2011.
27. Passone, M.A., Resnik, S., Etcheverry, M.G. (2005): *In vitro* effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B₁ accumulation by peanut *Aspergillus* section Flavi. *Journal of Applied Microbiology* 99: 682-691.
28. Passone, M.A., Resnik, S., Etcheverry, M.G. (2007): Antiaflatoxigenic property of food grade antioxidants under different conditions of water activity in peanut grains. *International Journal of Food Microbiology* 118: 8-14.
29. Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Pinto, E., Costa-de Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Martinez-de-Oliveira, J. (2004): Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *European Academy of Dermatology and Venereology* 18: 73-78.
30. Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.J., 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.
31. Reynoso, M., Torres, A.M., Ramirez, M.L., Rodriguez, M.I., Chulze, S.N., 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.
32. 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.
33. Slamenová, D., Horváthová, E., Wsólóvá, 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.
34. Svircev, A.M., Smith, R.J., Zhou, T., Hernandez, M., Liu, W., Chu, C.L. (2007): Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biology and Technology* 45: 228-233.
35. Stamatii, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L., Wright, A. (1999): Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology* 37: 813-823.
36. Thompson, D.P. (1992): Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia* 84: 791-793.
37. Thompson, D.P. (1996): Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection* 59: 412-415.

38. Thompson, D.P., Moldéus, P. (1988): Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 37: 2201-2207.
- Torres, A.M., Ramirez, M.L., Arroyo, M., Chulze, S.N., 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.
39. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marin, S. (2004): Effect of essential oils of cinnamon, clove, lemon grass, oregano and palmarosa on growth of and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* in maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 1141-1146.
40. Williams, G.M., Iatropoulos, M.J., Whysner, J. (1999): Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology* 37: 1027-1038.

GROWTH INHIBITION OF *FUSARIUM* SP. IN LIVESTOCK FEED

SUMMARY

Contamination with phytopathogenic forms of Fusarium, besides field crops, may also occur in stored products. Addition of antifungal substances to stored livestock feed is therefore common. This paper examined the effectiveness of a mixture of synthetic and natural antioxidants against the growth of Fusarium graminearum and F. verticillioides in a concentrate mixture. The most effective inhibition of growth was achieved with a mixture of butylated hydroxyanisole, propyl paraben and thymol.

Key-words: Fusarium graminearum, Fusarium verticillioides, concentrate mixture, antioxidants

(Primljeno 27. svibnja 2011.; prihvaćeno 04. studenoga 2011. - Received on 27 May 2011; accepted on 4 November 2011)