

## INHIBICIJA RASTA ZNAČAJNIH MIKOTOKSIKOGENIH GLJIVA DJELOVANJEM ANTI-FUNGALNIH TVARI U STOČNOJ HRANI

## INHIBITION OF GROWTH OF SIGNIFICANT MYCOTOXIGENIC FUNGI BY ANTI-FUNGAL AGENTS IN ANIMAL FEED

**Gabriella Kanižai Šarić, T. Klapac, B. Šarkanj, Zlata Milaković, Irena Jug**

Izvorni znanstveni članak - Original scientific paper  
Prilmeno - Received: 09. Lipanj - June 2013.

### SAŽETAK

Krmne smjese pohranjene u skladišta potrebno je zaštititi od kontaminacije gljivama i njihovim otrovnim sekundarnim metabolitima. Značajni fitopatogeni, koji na zrnju žitarica dopijevaju u skladišta i silose, ubrajaju se *Fusarium verticillioides* i *Fusarium graminearum* producenti fumonizina i trihotecena. U ovom je istraživanju ispitana učinkovitost više različitih smjesa tvari antifungalnih i antimikotoksikogenih osobina u supresiji rasta i biosintezi mikotoksina navedenih gljiva u stočnoj hrani. Najbolji učinak u inhibiciji rasta ostvaren je s kombinacijom butiliranog hidroksi-anisola, propil parabena i timola u ukupnoj koncentraciji od 700  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Međutim primjenom navedenih tvari, u dvostruko manjoj koncentraciji, zabilježena je stimulirana biosinteza fumonizina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>. Kod formuliranja kombinacija optimalnog supresivnog učinka u uvjetima skladištenja treba uzeti u obzir niz činitelja od abiotskih faktora do biotskih interakcija.

Ključne riječi: *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, krmna smjesa, deoksinivalenol, B fumonizini, antifungalne tvari

### UVOD

*Fusarium* vrste su podjednako učestale na kukuruza i žitaricama kako u polju, koševima, hambarama individualnih proizvođača, tako i u silosima i uskladištenim krmnim smjesama (Pepeljnjak i sur., 1999; Šegvić i Pepeljnjak 2003; Ivić i sur., 2009, Šegvić Klarić i sur. 2009). *Fusarium verticillioides* (Sacc.) je odgovoran za značajne gubitke prinosa i kvalitete zrna kukuruza (Warfield i sur., 1999). Ovaj fitopatogen je uzročnik truleži klipa i zrna kukuruza (Munkvold, 2003; Clements i sur., 2004). *F. verticillioides* sintetizira, uz najčešće prisutne fumonizine, i fuzaričnu kiselinu, fuzarine, moniliformin i beauvericin (Nelson, 1992; Bottalico i sur., 1995; Logrieco i sur. 2002; Glenn, 2007). Identificirane su četiri grupe fumonizina na temelju strukturalne sličnosti: A, B, C i P serija (Abbas i sur., 1998; Rheeder i sur., 2002; Krska i sur., 2007). B fumonizini, koje čine toksiko-

loški bitni FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> i FB<sub>3</sub>, su najrašireniji fumonizini u prirodi, dok FB<sub>1</sub> dominira i obično se nalazi u najvišoj koncentraciji (Rheeder i sur., 2002). Ingestija kukuruza kontaminiranog fumonizinima, povezana je s pojavom leukoencefalomalacije kopitara (Marasas, 1995), štakora i zečeva (Domijan, 2013), plućnog edema i hidrotoraksa svinja (Marasas, 1995).

Nadalje fumonizini su hepatotoksični i nefrotoksični na svim ispitivanim pokusnim (štakori, miševi) i domaćim životinjama (konji, svinje, preživači, ovce, janjad, perad, ribe, zečevi, kune) (Voss i sur.), a u svinja i konja toksični su i za kardiovaskularni sustav (Voss i sur., 2007). Fumonizini su povezani s razvojem karcinoma jednjaka (Sydenham i sur., 1990; Franceschi i sur., 1990; Shepard i sur., 2000), karcinoma jetre (Chu i sur., 1994; Ueno i sur., 1997) i oštećenjem neuralne cijevi u ljudi (Missmer i sur., 2006) u dijelovima svijeta gdje je osnovna, ili ba-

doc.dr.sc. Gabriella Kanižai Šarić (gkanizai@pfos.hr); prof.dr.sc. Zlata Milaković; izv.prof.dr.sc. Irena Jug - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni fakultet, Kralja P. Svačića 1d, 31 000 Osijek, R. Hrvatska; prof.dr.sc. Tomislav Klapac; Bojan Šarkanj, dipl.ing.-Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Prehrambeno-tehnološki fakultet, F. Kuhača 20, 31 000 Osijek, R. Hrvatska

rem vrlo česta, namirnica kukuruz i proizvodi od kukuruza (Voss i sur., 2007; Peraica i Rašić, 2012).

U značajne fitopatogone ubraja se i *Fusarium graminearum* (Schw.) koji je glavni uzročnik truleži korijena i vlati te paleži klasova pšenice u Hrvatskoj (Ćosić, 1997). 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 deoksinivalenola (DON) i njegovih acetiliranih formi te nivalenola, zearalenona, fuzarenona, diacetoksiscirpenola i neosolanio-la (Logrieco i sur., 2003; Geraldo i sur., 2006; Glenn, 2007) u samom zrnu, što povećava rizik od mikotoksikoza. 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). Akutni simptomi trovanja deoksinivalenolom uključuju gubitak težine, odbijanje hrane, povraćanje, krvavu dijareju i teške hemoragijske dermatitise (Eriksen, 2003). Simptomi akutne humane izloženosti DON-u uključuju mučninu, povraćanje, gastrointestinalne probleme, vrtoglavicu, dijareju i glavobolju (Hussein i sur., 2001; Creppy, 2002). S obzirom da je DON često izoliran iz hrane i stočne hrane na bazi žitarica postoji značajan rizik izloženosti ljudi i životinja ovom mikotoksinu (Pestka, 2010).

Analitička studija koju je provela Hrvatska agencija za hranu 2012. godine s ciljem prikazivanja stanja zaraženosti dominantnih krmiva (sačme soje i kukuruz) koja količinski čine najveći udio u svih krmnih smjesa utvrđena je prisutnost deoksinivalenola u 26% uzoraka kukuruza ( $n=181$ , granica detekcije  $55 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i u 30% uzoraka sojine sačme ( $n=119$ , granica detekcije  $55 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), fumonizin je otkriven u 56% uzoraka kukuruza ( $n=181$ , granica detekcije  $220 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a u sojinoj sačmi fumonizini nisu detektirani ( $n=119$ , granica detekcije  $220 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (HAH 2012). Uzorci su analizirani metodom ELISA.

U cilju kontrole razvoja plijesni i sinteze mikotoksina potrebno ih je prevenirati kroz identificiranje ključnih kritičnih kontrolnih točaka koje uključuju proces proizvodnje, prerade i skladištenja stočne hrane. Primjenom prikladnih kemijskih i bioloških tvari na polju i u skladištima i silosima nastoji se prevenirati rast plijesni i biosinteza mikotoksina (Kabak i sur., 2006). Ispituje se učinkovitost alternativnih

komponenti kao što su antioksidansi i eterična ulja u sprječavanju rasta plijesni i akumulacije mikotoksina u djelomično osušenom zrnu (Aldred i sur., 2004; Magan i sur., 2007). Fenolni antioksidanti poput butiliranog hidroksianisola 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). Međutim intenzivno se proučava i njihov fungitoksičan učinak na micelijski rast vrsta *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* i proizvodnju mikotoksina (Ahmand i sur., 1981; Lin i sur., 1983; Etcheverry i sur., 2002; Nesci i sur., 2003; Torres i sur., 2003). Različita istraživanja su utvrdila antifungalna i antimikotoksikogena svojstva butiliranog hidroksianisola. Prema istraživanjima Torres i sur. (2003) primjenom  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  butiliranog hidroksianisola pri  $a_w 0,95$  na sterilnom zrnu kukuruza utvrđena je redukcija micelijskog rasta *F. verticillioides* i *Fusarium proliferatum*. Također je utvrđena smanjena sinteza fumonizina primjenom  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  butiliranog hidroksianisola pri  $a_w 0,98$  u istom istraživanju (Torres i sur., 2003). Farnochi i sur. (2005) su utvrdili kako primjena  $1000 \mu\text{g g}^{-1}$  butiliranog hidroksianisola ima najbolji učinak u redukciji sinteze fumonizina.

Eterična ulja i njihove komponente posjeduju antifungalna (Moleyar i sur., 1986; Akgül i sur., 1988; Arras i sur., 2001; Elgayyar i sur., 2001; Daferera i sur., 2003) i antitoksikogena svojstva (Juglal i sur., 2002; Marin i sur., 2003; Selvi i sur., 2003; Velluti i sur., 2003). Osim toga, ona djeluju antibakterijski (Paster i sur., 1990; Hammer i sur., 1999; Elgayyar i sur., 2001; Al-Bayati, 2008), antiviralno (Duschatzky i sur., 2005), antiparazitno (Pandey i sur., 2000) i insekticidno (Konstantopoulou i sur., 1992).

Antifungalnu aktivnost pokazuju eterična ulja koja sadrže fenolnu komponentu, a to su oksigenirani monoterpeni (timol, karvakrol, citral) te fenolni benzenski derivati (eugenol) (Ruberto i sur., 2000). Nadalje, nezasićeni aldehidi strukturno slični citralu: heksenal, decenal, pentenal također posjeduju antifungalna svojstva (Moleyar i sur., 1986).

Mehanizam djelovanja antioksidanasa koji inhibiraju micelijski rast toksikogenih gljiva nije jasan (Aldred i sur., 2008). Thompson (1996) je utvrdio oštećenja stanične micelijske membrane koja vodi do pojačanog istjecanja šećera, aminokiselina i proteina iz fungalne stanice *Fusarium* sp. tretirane s butiliranim hidroksianisolom. Inhibitorni učinak

aromatičnih tvari najčešće je povezan s hidrofobnošću, ove tvari se umeću 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, RNK i DNK i uništavaju membranski potencijal (Eklund i sur., 1989).

S obzirom da nedostaju istraživanja djelotvornosti sintetskih antioksidanasa i eteričnih ulja u krmnim smjesama cilj ovog istraživanja bio je utvrditi njihovu učinkovitost u inhibiciji micelijskog rasta *F. verticillioides* i *F. gramineum* te na sintezu fumonizina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> i deoksinivalenola.

## MATERIJAL I METODE RADA

Fungalni izolati korišteni u istraživanju obuhvatili su čiste kulture *Fusarium graminearum* 110250 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska) i *Fusarium verticillioides* M-1325 (Fusarium Research Center, Penn State University, SAD). Navedeni sojevi su izolirani iz uzoraka kukuruza s područja južne Afrike a utvrđeno ja kako posjeduju dobru sposobnost biosinteze trihotecena i fumonizina (Alberts i sur., 1990; O'Donnell i sur. 2000; Rheeder i sur., 2002). Prema O'Donnell i sur. (2000) navedeni soj *F. graminearum* sintetizira deoksinivalenol i zearalenon u granicama od 151 do 3 000 mg kg<sup>-1</sup> dok su Alberts i sur. (1990) zabilježili proizvodnju FB<sub>1</sub> u količini od 17,9 g kg<sup>-1</sup> na zrnu kukuruza inokuliranim s *F. verticillioides* sojem M-1325. Inokulacija i inkubacija navedenih sojeva je provedena na kumpir-dekstroznom agaru (BioLife) kroz 5 dana na 25 °C ± 0,2.

Kao supstrat je odabrana gotova krmna smjesa za piliće PPT-2 (Belje, R. Hrvatska) koju čini kukuruz (51%), tostirana soja (20%) i sojina sačma (20%). Krmna smjesa je sterilizirana gama zrakama od 12 kGy (panoramski izvor <sup>60</sup>Co) u trajanju od deset sati dok je željeni aktivitet krmne smjese (a<sub>w</sub> 0,95) određen prema krivulji adsorpcije vlage krmiva (Marin i sur., 1998) i provjeren a<sub>w</sub>-metrom (Rotronic, Bassersdorf, Švicarska). Nakon sterilizacije u krmnim smjesama nije zabilježeno prisustvo mikroorganizama (HRN ISO postupci) kao niti prisustvo deoksinivalenola i fumonizina (ekstrakcija iz uzorka, prečišćavanje ko-

lonama i analiza na HPLC uređaju).

Ispitane su sljedeće antifungalne tvari: propil paraben, butilirani hidroksanisol, eugenol, pentenal, heksenal, decenal, timol, eugenol karvakrol, etoksikvin i citral (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) u različitim kombinacijama i koncentracijama koje su odabrane na osnovu preliminarnih istraživanja. Navedene tvari su odvagane (Mettler Toledo AB 204-S, preciznosti 0,1 mg) u sterilnim uvjetima i otopljene u 95 % alkoholu, deioniziranoj vodi (sustav Millipore Simplicity) i 10 % Tweenu 80 (9:2:2) nakon čega su umiješane u stočnu hranu uz hidrataciju deioniziranom vodom do 0,95 aktiviteta vode. Koncentracije antifungalnih tvari iznosile su od 450 do 700 μg g<sup>-1</sup> ukupne koncentracije. Kontrolna skupina je sadržavala sterilnu vodu umiješanu u krmnu smjesu. Nakon 48 sati uravnoteženja vlage (Torres i sur., 2003) krmne smjese su u sterilnim uvjetima razvagane (20 g) u sterilne petrijeve zdjelice (promjera 90 mm) (Torres AM i sur., 2003; Ramirez i sur., 2006). Inokulacija krmnih smjesa je provedena centralno s micelijem promjera 7 mm koji je uzet s rubova kolonija čistih kultura (Marin i sur., 1995; Torres i sur., 2003). Petrijeve zdjelice su pohranjene 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) i inkubirane su na 25 °C ± 0,2 °C u termostatskom kabinetu (AL 500-8, Aqualytic). Sve ispitane skupine su sadržavale tri ponavljanja. Svakodnevno je praćen porast gljiva izmjeravanjem dva promjera kolonije pod pravim kutom dok kolonija nije dosegla rub petrijeve zdjelice.

Uzorci su čuvani (oko 3. mjeseca) pri -20 °C do analize mikotoksina. Određivanje deoksinivalenola obuhvatilo je ekstrakciju iz uzorka i prečišćavanje kolonama na čvrstoj fazi (MultiSep 227 Trich+, RomerLabs) (Pettersson i sur., 2011). Određivanje fumonizina obuhvatilo je ekstrakciju i prečišćavanje imunoafinitetnim kolonama prema uputama proizvođača (FumoniTest™, Vicam 2004) (Silva i sur., 2009). Obje skupine mikotoksina detektirane su pomoću HPLC sustava (Varian ProStar, SAD).

Primjenom linearne regresije određena je stopa rasta. Normalnost raspodjele promatranih numeričkih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnov testom. Skupovi podataka testirani su Studentovim t-testom. Za statističku analizu podataka korišteni su

programski sustav Excel 2003 (Microsoft) i Statistica (StatSoft 8).

## REZULTATI I RASPRAVA

Na osnovu preliminarnih istraživanja butilirani hidroksianisol je odabran kao stalni sastojak ispitivanih smjesa tvari zbog svojih antifungalnih osobina (Thompson 1992; Torres i sur., 2003; Farnochi i sur., 2005; Jay i sur., 2005), dok se druge ispitivane antifungalne tvari u kombinacijama mijenjaju (Tablica 1). U kombinaciji jedan i dva, koje sadržavaju eugenol, nije zabilježen inhibitoran učinak primijenjenih tvari. Drugi autori su zabilježili fungicidalan učinak eugenola, tako su Morcia i sur. (2012) utvrdili da eugenol u koncentraciji od 0,014 % inhibira micelijski rast *Fusarium culmorum* na umjetnoj hranjivoj podlozi (Morcia i sur., 2012) dok su Velluti i sur. (2004) primjenom 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  ulja klinčića, koje sadrži eugenol, na sterilnom zrnu kukuruza zabilježili inhibiciju micelijskog rasta *F. verticillioides*. U kombinaciji tri i pet, koje sadrže heksenal, primijenjeno je 500 do 600  $\mu\text{g g}^{-1}$  ukupne koncentracije koja nije dovoljna u supresiji rasta ispitivane plijesni. Drugačije rezultate su zabilježili Menniti i sur. (2010) koji su uspjeli reducirati rast *F. verticillioides* primjenom 246  $\mu\text{l l}^{-1}$  heksenala na zrnu kukuruza međutim ova doza nije bila dovoljna u redukciji sinteze fumonizina u istom istraživanju. Kombinacija četiri (butilirani hidroksianisol + propil paraben) uzrokuje dvostruko dužu lag fazu od kontrolne, ali je ova kombinacija tvari i dalje nedovoljna u inhibiciji rasta *F. verticillioides*. Suprotno je utvrdio Thompson (1993) koji je tretmanom s 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  butiliranog hidroksianisola i 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  propil parabena utvrdio inhibiciju konidijalne germinacije *Fusarium* sp. na umjetnom supstratu, s tim da je učinkovitost propil parabena bila veća. Djelovanje karvakrola (kombinacija šest) nema zadovoljavajući učinak u kontroli rasta ispitivane plijesni. Međutim inhibitoran učinak karvakrola su zabilježili Velluti i sur. (2004a) u koncentraciji od 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  na sterilnom zrnu kukuruza u redukciji rasta *F. verticillioides*. Također niti etoksikvin, sastojak kombinacije sedam ne pokazuje antifungalna svojstva pri 450  $\mu\text{g g}^{-1}$  ukupne koncentracije. Nadalje, smjese tvari butiliranog hidroksianisola s citralom (kombinacije devet do 11) i nezasićenim aldehidima reducirale su rast plijesni za 4 do 6%. Velluti i sur. (2004a) su zabilježili slične rezultate u čijem je istraživanju primjenom eteričnog ulje limunske trave, čiji je glavni sasto-

jak citral, nije zabilježena značajna inhibicija rasta *F. verticillioides* na sterilnom zrnu kukuruza. Osim u kombinaciji četiri, butilirani hidroksianisol i propil paraben je ispitan i u većoj koncentraciji u kombinaciji 13. U ovoj koncentraciji primijenjenih tvari zabilježena je šest puta duža lag faza i redukcija rasta *F. verticillioides* za 37%. Sukladno ovome, istraživanja Reynoso i sur. (2002) su utvrdila inhibitoran učinak kombinacije butiliranog hidroksianisola i propil parabena na rast *F. verticillioides*, ali uz manje koncentracije od 90 i 180  $\mu\text{g g}^{-1}$ , ali 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 butiliranog hidroksianisola s timolom (kombinacije osam i 12). Najdjelotvornija smjesa tvari utvrđena je u kombinaciji 14, u ukupnoj koncentraciji od 700  $\mu\text{g g}^{-1}$ , pri čemu je utvrđena redukcija rasta *F. verticillioides* za 65% uz četiri puta dužu lag fazu u odnosu na kontrolu, što je statistički vrlo značajna razlika ( $p < 0,01$ ).

Utjecaj ispitanih antifungalnih kombinacija na micelijski rast *F. graminearum* rezultirao je produženom lag fazom od jedan do 11 dana u odnosu na kontrolu (Tablica 2). Kombinacije i koncentracije antifungalnih tvari, osim kombinacije 14, nisu bile dovoljno učinkovite u inhibiciji rasta *F. graminearum* najvjerojatnije zbog nedovoljne primijenjene koncentracije koje su iznosile 450 do 600  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Kombinacije butiliranog hidroksianisola s propil parabenom i butiliranog hidroksianisola s timolom ukupne koncentracije 600  $\mu\text{g g}^{-1}$  (kombinacija 12 i 13) reduciraju micelijski rast *F. graminearum* od 48 do 55 % međutim bez statističke značajnosti. Ove smjese tvari imaju najvjerojatnije antifungalni sinergistički učinak. I drugi istraživači su zabilježili antifungalna svojstva butiliranog hidroksianisola, propil parabena i timola. Torres i sur. (2003) su primjenom 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  propil parabena reducirali micelijski rast *Fusarium* na sterilnom zrnu kukuruza dok timol u potpunosti sprječava rast *F. verticillioides* pri istoj koncentraciji, ali na umjetnoj hranjivoj podlozi (Dambolena i sur., 2008). Smjesa antifungalnih tvari u kombinaciji 14 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* 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

**Tablica 1. Utjecaj antifungalnih tvari na lag fazu i stopu rasta *Fusarium verticillioides* u krmnoj smjesi pri  $a_w$  0,95 i 25 °C**

**Table 1. Effect of antifungal mixtures on the lag phase and growth rate of *Fusarium verticillioides* in animal feed at  $a_w$  0,95 and 25 °C**

kombinacije antifungalnih tvari antifungal mixtures	koncentracija ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) concentration	lag faza (dani) lag phase (days)	stopa rasta (mm/dan) growth rate (mm/day)
kontrola - control		3	4,2
1. butilirani hidroksianisol+eugenol mixture 1: butylated hydroxyanisol+eugenol	250+250	9	2,5
2. butilirani hidroksianisol+eugenol+heksenal mixture 2: butylated hydroxyanisol+eugenol+hexenal	100+250+100	7	2,5
3. butilirani hidroksianisol+heksenal mixture 3: butylated hydroxyanisol+hexenal	250+250	7	2,5
4. butilirani hidroksianisol+propil paraben mixture 4: butylated hydroxyanisol+propyl paraben	250+250	4	3,7
5. butilirani hidroksianisol+propil paraben+heksenal mixture 5: butylated hydroxyanisol+propyl paraben+hexenal	250+150+100	2	4,4
6. butilirani hidroksianisol+karvakrol mixture 6: butylated hydroxyanisol+carvacrol	250+250	3	4,6
7. butilirani hidroksianisol+etoksikvin mixture 7: butylated hydroxyanisol+etoxyquin	250+200	3	4,3
8. butilirani hidroksianisol+timol mixture 8: butylated hydroxyanisol+ thymol	250+250	7	3,5
9. butilirani hidroksianisol+pentenal mixture 9: butylated hydroxyanisol+pentenal	250+250	3	4,2
10. butilirani hidroksianisol+heksenal+decenal mixture 10: butylated hydroxyanisol+hexenal+decenal	150+200+150	3	4,3
11. butilirani hidroksianisol+citral mixture 11: butylated hydroxyanisol+citral	250+250	3	4,3
12. butilirani hidroksianisol+timol mixture 12: butylated hydroxyanisol+thymol	300+300	11	3,1
13. butilirani hidroksianisol+propil paraben mixture 13: butylated hydroxyanisol+propyl paraben	300+300	11	3,0
14. butilirani hidroksianisol+timol+propil paraben mixture 14: butylated hydroxyanisol+thymol +propyl paraben	250+250+200	9	1,6**a

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

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

koji je uzrokovao teška oštećenja stanice, a koja su spriječila daljnju diobu i rast micelija.

Prema Pravilniku o dodacima hrani za životinje (Narodne novine Republike Hrvatske br. 86/2011), a koji preuzima uredbu br. 1831/2003 Europskog parla-

menta o dodacima hrani za životinje, butilirani hidroksianisol i etoksikvin su dozvoljeni antioksidansi u hrani za životinje. Također, krmnim se smjesama mogu dodavati sredstva za poboljšanje okusa prirodnog podrijetla, a u ovu kategoriju se uvrštava timol, citral, karvakrol, eugenol, pentenal, decenal i heksenal.

**Tablica 2. Utjecaj antifungalnih tvari na lag fazu i stopu rasta *Fusarium graminearum* u krmnoj smjesi pri  $a_w$  0,95 i 25 °C**

**Table 2. Effect of antifungal mixtures on the lag phase and growth rate of *Fusarium graminearum* in animal feed at  $a_w$  0,95 and 25 °C**

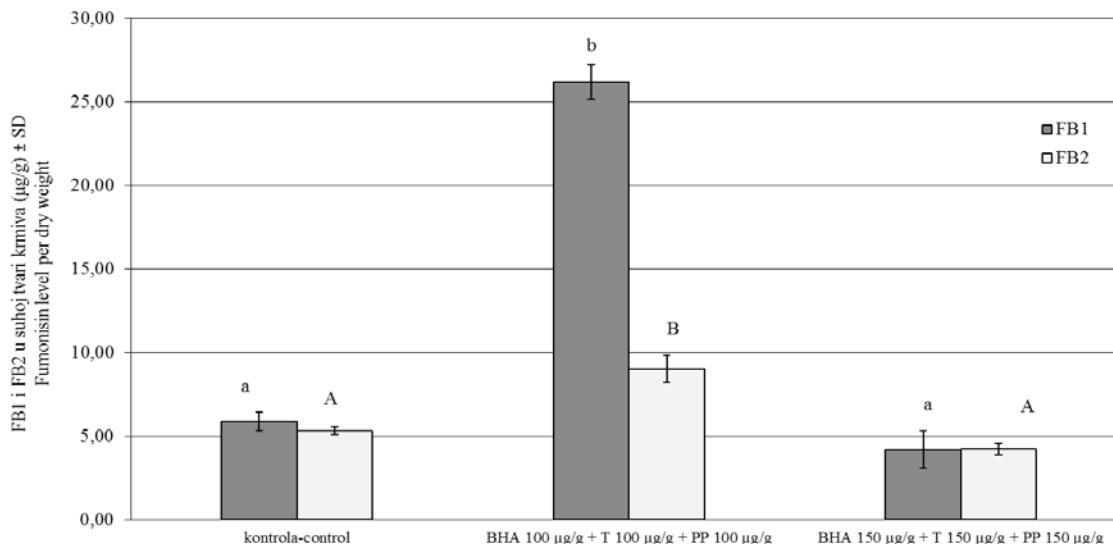
kombinacije antifungalnih tvari antifungal mixtures	koncentracija ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) concentration	lag faza (dani) lag phase (days)	stopa rasta (mm/dan) growth rate (mm/day)
kontrola - control		3	5,8
1. butilirani hidroksianisol+eugenol mixture 1: butylated hydroxyanisol +eugenol	250+250	8	4,1
2. butilirani hidroksianisol+eugenol+heksenal mixture 2: butylated hydroxyanisol+eugenol+hexenal	100+250+100	8	3,8
3. butilirani hidroksianisol+heksenal mixture 3: butylated hydroxyanisol+hexenal	250+250	9	3,7
4. butilirani hidroksianisol+propil paraben mixture 4: butylated hydroxyanisol+propyl paraben	250+250	6	4,8
5. butilirani hidroksianisol+propil paraben+heksenal mixture 5: butylated hydroxyanisol+propyl paraben+ hexenal	250+150+100	5	5,5
6. butilirani hidroksianisol+karvakrol mixture 6: butylated hydroxyanisol+carvacrol	250+250	4	5,7
7. butilirani hidroksianisol+etoksikvin mixture 7: butylated hydroxyanisol+etoxiquin	250+200	5	5,5
8. butilirani hidroksianisol+timol mixture 8: butylated hydroxyanisol+thymol	250+250	10	3,8
9. butilirani hidroksianisol+pentenal mixture 9: butylated hydroxyanisol+pentenal	250+250	4	6,1
10. butilirani hidroksianisol+heksenal+decenal mixture 10: butylated hydroxyanisol+hexenal+ decenal	150+200+150	5	5,6
11. butilirani hidroksianisol+citral mixture 11: butylated hydroxyanisol+citral	250+250	5	5,2
12. butilirani hidroksianisol+timol mixture 12: butylated hydroxyanisol+thymol	300+300	14	3,0
13. butilirani hidroksianisol+propil paraben mixture 13: butylated hydroxyanisol+propyl paraben	300+300	13	2,6
14. butilirani hidroksianisol+timol+propil paraben mixture 14: butylated hydroxyanisol+ thymol +propyl paraben	250+250+200	13	1,4**a

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

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

**Slika 1: Koncentracija fumonizina B1 i B2 u suhoj tvari krmiva uz odabrane kombinacije tvari**

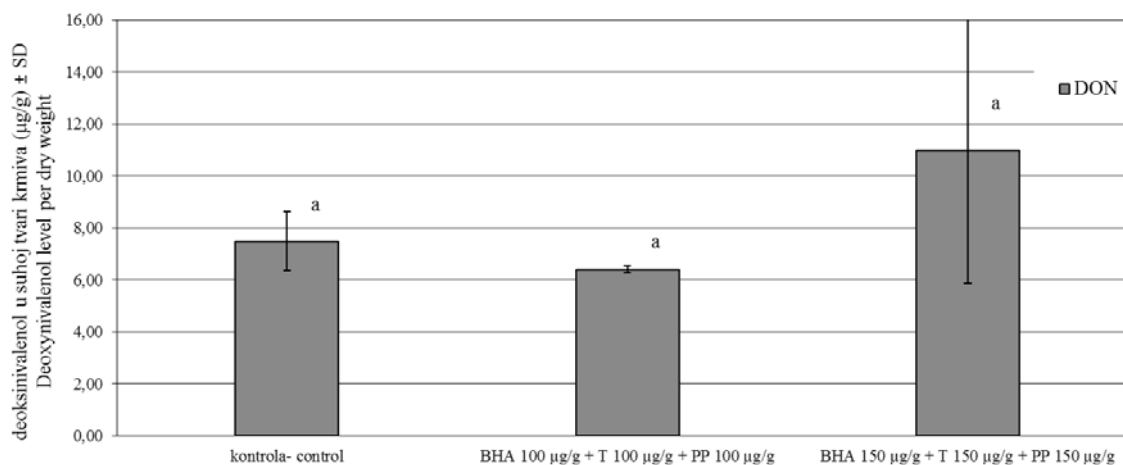
**Figure 1. Fumonisin level in chicken concentrate mixture treated with antifungal mixtures**



BHA: butilirani hidroksianisol-butylated hydroxyanisol; T: timol-thymol; PP: propil paraben-propyl paraben  
 Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ )

**Slika 2. Koncentracija deoksinivalenola u suhoj tvari krmiva uz odabrane kombinacije tvari**

**Figure 2. Deoxynivalenol level in chicken concentrate mixture treated with antifungal mixtures**



BHA: butilirani hidroksianisol-butylated hydroxyanisol; T: timol-thymol; PP: propil paraben-propyl paraben  
 Vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ )

Djelotvornost kombinacije tvari butiliranog hidroksianisola, timola i propil parabena na biosintezu fumonizina i deoksinivalenola ispitana je u ukupnoj koncentraciji od 300 i 450  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Analizom podataka utvrđena je statistički značajno veća proizvodnji fumonizina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> između kombinacije jedan i kon-

trole (Slika 1). Torres i sur. (2003) su također utvrdili stimulaciju proizvodnje fumonizina pri  $a_w$  0,95 na ozračenom zrnu kukuruza tretiranom s 100 i 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  butiliranog hidroksianisola, koja nastaje pod određenim stresnim okolišnim abiotskim uvjetima kao što su pristupačnost vode, temperatura kao i njihove interakcije.

Pri  $a_w$  0,95 (Slika 2) ispitane kombinacije nisu bile uspješne u inhibiciji biosinteze deoksinivalenola. Slične rezultate zabilježili su i Velluti i sur. (2004b) u čijem je istraživanju nije utvrđeno značajna inhibicija sinteze DON-a djelovanjem eteričnih ulja cimeta, klinčića i limunske trave na sterilnom zrnu kukuruza pri  $a_w$  0,95.

## ZAKLJUČCI

Kombinacija butiliranog hidroksianisola, propil parabena i timola u ukupnoj koncentraciji od  $700 \mu\text{g g}^{-1}$  reducira micelijski rast fitopatogena *F. verticillioides* i *F. graminearum* na krmnoj smjesi za piliće PPT-2. Međutim, primjenom navedenih tvari u ukupnoj koncentraciji od  $300 \mu\text{g g}^{-1}$  zabilježena je četiri puta veća koncentracija fumonizina B<sub>1</sub> u usporedbi s kontrolom. Neophodna su daljnja istraživanja, a koja bi trebala detaljnije razjasniti uvjete pod kojima dolazi do pojačane stimulacije proizvodnje fumonizina. Također su potrebna istraživanja koja bi obuhvatila i druge abiotičke (temperatura, pH) i biotičke faktore koji utječu na rast mikotoksikogenih gljiva i sintezu mikotoksina u skladištima i silosima.

## 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.
- Alberts, J. F., Gelderblom, W. C. A., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Van Schalkwyk, D. J., Behrend, Y. (1990): Effects of temperature and incubation period on the production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1729–1733.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, J.W., Klich, M. (2003): Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16: 497–516.
- Bottalico, A., Logrieco, A., Ritieni, A., Moretti, A., Randazzo, G., Corda, P. (1995): Beauvericin and fumonisin B<sub>1</sub> in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. *Food Additives and Contaminants* 12: 599–607.
- Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253.
- Chu, F.S., Li, G.Y. (1994): Simultaneous occurrence of fumonisin B1 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.
- Clements, M.J., Maragos, C.M., Pataky, I.K., White, D.G. (2004): Sources of resistance to fumonisin accumulation in grain and *Fusarium* ear and kernel rot of corn. *Genetics and Resistance* 94: 251–260.
- Creppy, E.E. (2002): Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19–28.
- 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. (2001): *Fusarium* vrste s različitim domaćina i njihova patogenost za klijanje 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.



19. 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.
20. Dambolena, J.S., López, A.G., Cánepa, M.C., Theu-merc, M.G., Zygadlo, J.A., Rubinstein, H.R. (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.
21. Domijan, A.-M. (2013): Rezultati nedavnih studija o mehanizmu neurotoksičnosti fumonizina B<sub>1</sub>. *Krmiva* 55: 25-33.
22. Eklund, T. (1989): Organic acids and esters. Mechanisms of action of food preservation procedures. Elsevier Applied Science, New York.
23. 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.
24. Eriksen, G.S. (2003): Metabolism and toxicity of trichothecenes. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala
25. 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.
26. Farnochi, M.C., Torres, A.S.M., Magan, N., Chulze, S.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.
27. Franceschi, S., Bidoli, E., Baron, A.E., 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.
28. Geraldo, M.R.F., Tessmann, D.J., Kimmelmeier, C. (2006): Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 58-63.
29. 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.
30. Giridhar, P., Reddy, S.M. 2001. Phenolic antioxidants for control of some mycotoxigenic fungi. *Journal of Food Science and Technology* 38: 397-399.
31. Glenn, A.E. (2007): Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 137: 213-240.
32. HAH (Hrvatska agencija za hranu) (2012): Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje. (HAH-Z-2012-05).
33. Hayes, J.D., Pulford, D.J., Ellis, E.M., McLeod, R., James, R.F.L., Seidegard, J., Mosialou, E., Jernström, B., Neal, G.E. (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.
34. Hussein, H.S., Brasel, J.M. (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101-134.
35. Ivić, D., Domijan, A.-M., Peraica, M., Miličević, T., Cvjetković, B. (2009): *Fusarium* spp. contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 60, 435-442.
36. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005): *Modern Food Microbiology*. Springer Science & Business Media Inc.
37. Jayashree, T., Subramanyam, C. (1999): Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology* 28: 179–183.
38. 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.
39. Kabak, B., Dobson, A.D.W., 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.
40. Lanciotti, R., Belletti, N., Patrignani, F., Gianotti, A., Gardini, F., Guerzoni, M.E. (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.
41. 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.
42. 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.

43. Logrieco A, Botalico 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.
44. Magan, N., Aldred, D. (2007): Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119: 131-139.
45. Marasas, W.F.O. (1995): Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural Toxins* 3: 193-198.
46. Marin, S., Sanchis, V., Vinas, I., Canela, R., Magan, N. (1995): Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1, and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Letters in Applied Microbiology* 21: 298-301.
47. Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Magan, N. (1998): 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.
48. Menniti, A.M., Gregori, R., Neri, F. (2010): Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. *International Journal of Food Microbiology* 136: 304-309
49. 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.
50. 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.
51. Morcia, C., Malnati, M., Terzia, V. (2012): In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives and Contaminants* 29: 415-422.
52. Moleyar, V., Narasimham, P. (1986): Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology* 3: 331-336.
53. Morgavi, D.P., Riley, R.T. (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.
54. Munkvold, G.P. (2003): Epidemiology of *Fusarium* disease and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705-713.
55. Nelson, P., E. (1992): Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117: 29-36.
56. Narodne novine. (2011): Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva: Pravilnik o dodacima hrani za životinje br. 86. Službeni list Republike Hrvatske.
57. 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.
58. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K. and Casper, H. H. (2000): Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 97: 7905-7910.
59. 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.
60. Peraica, M., Rašić, D. (2012): Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva* 54: 81-87.
61. Pestka, J.J. (2010): Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology* 84: 663-679.
62. Pettersson H., Brown, C., Hauk, J., Hoth, S., Meyerb, J., Wessels, D. (2011): Survey of T-2 and HT-2 toxins by LC-MS/MS in oats and oat products from European oat mills in 2005-2009. *Food Additives and Contaminants: Part B* 4: , 110-115.
63. Pons, N., Pinson-Gadaisa, L., Barreaud, C., Richard-Forgeta, F., Ouellet, T. (2007): Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters* 581: 443-447.
64. 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.
65. Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Vismar, H.F. (2002): Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2101-2105

66. Ruberto, G., Baratta, M.T. (2000): Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69: 167-174.
67. 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.
68. Shepard, G.S., Marasas, W.F., Leggott, N.L., Yazdanpanah, H., Rahimian, H., Safavi, N. (2000): Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 1860-1864.
69. Silva, L., Fernández-Franzón, M., Font, g., Pena, A., Silveira, I., Linop, C., Mañes, J. (2009): Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors. *Food chemistry* 112: 1031-1037.
70. Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shepard, G.S., Schalkwyk, D.J., Koch, K.R. (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
71. 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.
72. Šegvić, M., Pepeljnjak, S. (2003): Distribution and fumonisin B1 production capacity of *Fusarium moniliforme* isolated from corn in Croatia. *Periodicum Biologorum* 105: 275-279.
73. Šegvić Klarić, M., Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S., Kosalec, I. (2009): Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 60, 427-434.
74. Thompson, D.P. (1992): Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia* 84: 791-793.
75. Thompson, D.P., 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.
76. Thompson, D.P. (1996): Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection* 59: 412-415.
77. 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.
78. Turner, P.C., Nikiema, P., Wild, C.P. (1999): Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research* 443: 81-93.
79. 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.
80. Utto, W., Mawson, A.J., Bronlund, J.E. (2008): Hexanal reduces infection of tomatoes by *Botrytis cinerea* whilst maintaining quality. *Postharvest Biology and Technology* 47: 434-437.
81. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., 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.
82. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marin, S. (2004a): 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.
83. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Turon, C., Marin, S. (2004b): 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.
84. Visconti, A. (2001): Problems associated with *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University* 9: 39-55.
85. Voss, K.A., Smith, G.W., Haschek, W.M. (2007): Fumonisin: toxicokinetics, mechanisms of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology* 137: 299-325.

86. Warfield, C.Y., Gilchrist, D.G. (1999). Influence of kernel age on fumonisin B<sub>1</sub> production in maize by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2853-2856.
87. 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.

#### SUMMARY

Concentrate mixtures stored in storages need to be protected from contamination by fungi and their toxic secondary metabolites. Significant phytopathogenic fungi in Croatia are *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* producers of trichothecenes and may occur in storages on the grain cereals. In this research, influence of different antifungal and antimycotoxigenic mixtures on growth and mycotoxins synthesis of these fungi was investigated in concentrate mixtures. The most effective inhibition of growth was achieved with a mixture of butylated hydroxyanisole, propyl paraben and thymol in the total concentration of 700 µg g<sup>-1</sup>. However it was recorded that application of these substances in half the concentration stimulated biosynthesis of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. Results indicate variety of factors from abiotic conditions to biotic interactions that should be taken into account when formulating combinations with optimal suppressive effect in storage conditions.

Key words: *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, concentrate mixtures, deoxynivalenol, fumonisins B, antifungal mixtures