UČINKOVITOST SMJESA ANTIFUNGALNIH TVARI NA RAST FUSARIUM GRAMINEARUM I SINTEZU B TRIHOTECENA U KRMNIM SMJESAMA

Dorotić, Danijela

Master's thesis / Diplomski rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:987910

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Danijela Dorotić, apsolvent
Diplomski studij
Smjer: Ekološka poljoprivreda

UČINKOVITOST SMJESA ANTIFUNGALNIH TVARI NA RAST *FUSARIUM GRAMINEARUM* I SINTEZU B TRIHOTECENA U KRMNIM SMJESAMA

DIPLOMSKI RAD

OSIJEK, 2011

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Danijela Dorotić, apsolvent
Diplomski studij
Smjer: Ekološka poljoprivreda

UČINKOVITOST SMJESA ANTIFUNGALNIH TVARI NA RAST *FUSARIUM GRAMINEARUM* I SINTEZU B TRIHOTECENA U KRMNIM SMJESAMA

DIPLOMSKI RAD

OSIJEK, 2011

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Danijela Dorotić, apsolvent
Sveučilišni diplomski studij
Smjer: Ekološka poljoprivreda

UČINKOVITOST SMJESA ANTIFUNGALNIH TVARI NA RAST *FUSARIUM GRAMINEARUM* I SINTEZU B TRIHOTECENA U KRMNIM SMJESAMA

DIPLOMSKI RAD

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Zlata Milaković, predsjednik

2. Doc. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, voditelj

3. Prof. dr. sc. Željko Bukvić, član

OSIJEK, 2011

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1. Predstavnici roda *Fusarium*.....2

1.2. Fitopatogenost *Fusarium graminearum*.....3

1.3. Mikotoksini.....4

1.3.1. Trihoteceni.....5

1.4. Optimalni uvjeti za rast *Fusarium* sp. 6

1.5. Prevencija razvoja mikotoksina.....7

1.5.1. Antioksidansi.....8

1.5.1.1. Sintetski antioksidansi.....8

1.5.1.2. Prirodni antioskidansi.....9

1.5.2. Masne kiseline.....11

2. MATERIJAL I METODOLOGIJA RADA.....13

2.1. Čista kultura *Fusarium graminearum*.....13

2.2. Krmne smjese.....14

2.3. Antioksidansi i masne kiseline.....15

2.4. Priprema smjese antioksidanasa i masnih kiselina.....15

2.5. Inokulacija krmnih smjesa.....15

2.6. Inkubacija krmnih smjesa.....16

2.7. Određivanje mikotoksina.....17

2.7.1. Analiza trihotecena tipa B.....17

2.7.1.1. Prečišćavanje SPE kolone.....18

2.7.2. HPLC uvjeti.....19

2.8. Statistička obrada podataka.....19

3. REZULTATI.....20

3.1. Rast *F. graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98.....20

3.2. Rast *F. graminearum* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama antifungalnih tvari pri aw 0,98.....21

3.3. Odabrane kombinacije antifungalnih tvari za određivanje trihotecena tipa B u krmnim smjesama.....22

3.3.1. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi PPT-2.....22

3.3.2. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi SK-D-N.....23
4. RASPRAVA.....24
4.1. Učinkovitost kombinacija i koncentracija antifungalnih tvari na rast *Fusarium graminearum*.....24
4.2. Trihoteceni tipa B u krmnim smjesama.....25
5. ZAKLJUČAK.....26
6. POPIS LITERATURE.....27
7. SAŽETAK.....33
8. SUMMARY.....34
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....35

Prilog 1. Popis kratica

3-AcDON	3-acetil deoksinivalenol
15-AcDON	15-acetil deoksinivalenol
aw	aktivitet vode
BHA	butilirani hidroksianisol
C8	oktanska kiselina
C10	dekanska kiselina
DON	deoksinivalenol
HPLC	High performance liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
PP	propil paraben
PPT-2	krmna smjesa PPT-2
SK-D-N	krmna smjesa SK-D-N
SPE	solid phase extraction
T	timol
NIV	nivalenol
WHO	World Health Organisation

1. UVOD

Toksikogene vrste plijesni iz roda *Fusarium* često se nalaze kao kontaminanti na biljnim namirnicama, naročito na žitaricama koje mogu biti visoko primamljive za rast plijesni tijekom rasta u polju, uskladištenja i prerade (Stoloff, 1976.). Unatoč naporima uloženih u kontrolu gljivičnih kontaminacija, plijesni su sveprisutne u prirodi. *Fusarium* sp. zahvaljujući velikoj sposobnosti prilagođavanja na različite, često ekstremne uvjete, široko je rasprostranjen u gotovo svim agroklimatskim područjima svijeta.

Kontaminacija usjeva rodom *Fusarium* može nastati prije žetve (na polju), ali i poslije žetve (u skladištima i silosima). Plijesni ovog roda metaboliziraju raznolik niz toksičnih metabolita pod nazivom mikotoksini, koji predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi i životinja. Odavno je poznato da ove plijesni izazivaju opsežna kvarenja namirnica, krme i ostalog organskog materijala, ali o njihovom toksičnom djelovanju na više organizme nije se ništa pouzdano znalo do prije četiri desetljeća.

Mikotoksini su iznimno važni za skupine životinja kao što su mliječna goveda, svinje i perad budući da njihov visoki prinos rasta izravno ovisi o krmi koja se najčešće dobiva od biljaka. Posebno su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama. Zbog različitosti u kemijskoj strukturi, širok je raspon toksičnih učinaka koje izazivaju. Neke od najčešće prisutnih mikotoksina su karcinogeni, genotoksični ili toksični za bubrege, jetru i imunološki sustav. Većina mikotoksina kemijski je stabilna, te se ne razgrađuje tijekom skladištenja i procesiranja, čak i kada su izloženi velikim temperaturama.

Kako bi izbjegli kontaminaciju i štetno djelovanje gljiva i njihovih produkata na zdravlje ljudi i životinja potrebno je uskladištene materijale (stočnu hranu) pravovremeno zaštititi. Nadzor fungalnog rasta obuhvaća korištenje prirodnih (npr. eterična ulja, masne kiseline) i kemijskih konzervanasa u skladištima i silosima. Svrha dodavanja konzervanasa je produženje održljivosti hrane i prevencija kvarenja, odnosno mikrobiološke kontaminacije. Niz ispitivanja potvrđuje opću antimikrobnu, antifugalnu i antimikotoksikogenu djelotvornost različitih sintetskih i prirodnih antioksidanasa.

1.1. Predstavnici roda *Fusarium*

Rod *Fusarium* ubrajamo u pododjel *Deuteromycotina*, razred *Hyphomycetes*, red *Hyphales*, dok spolni stadij, ako je poznat, pripada pododjelu *Ascomycotina*, razredu *Pyrenomycetes*, redu *Hypocreales*. Rod sadrži veliki broj vrsta koje su uglavnom saprofiti, a fitoparazitne vrste pripadaju u skupinu fakultativnih parazita. *Fusarium graminearum* rasprostranjen je u svim uzgojnim područjima pšenice, ječma i kukuruza (Kommedahl i sur., 1979., Hill i sur. 1983., Leslie i sur., 1990., Diaz de Ackermann i sur., 1996., Chakaeva, 2000., Kryuchkova i sur. 2002.), a u našoj je zemlji glavni uzročnik truleži korijena i donjih internodija stabljike i paleži klasova pšenice i ječma (Tomasović, 1993., Ćosić, 1997., Jurković i sur., 1998.). Plijesan domininira na klasovima pšenice i drugih žitarica u zemljama srednje i sjeverne Europe (Snijders, 1990., Miedaner, 1997.), a važan je parazit stabljike, klipa i zrna kukuruza (Jurković, 1981., Windels i sur., 1988.) te velikog broja biljaka izvan porodice *Poaceae* (Booth, 1971.). Ove kulture predstavljaju bitnu sirovinu za prehrambenu industriju, kao i značajan izvor hrane za sve domaće životinje.

Rasprostranjenost pojavljivanja varira ovisno o klimatskim uvjetima, prije svega tijekom žetve, transporta te tijekom kasnijeg uskladištenja. Tijekom sedam godina istraživanja na deset lokaliteta u Hrvatskoj, dominantna izolirana vrsta sa svih dijelova pšenice bila je *F. graminearum* (Ćosić i sur., 2004). Svake godine bilježi se jači ili slabiji napad svih tipova bolesti koje izazivaju *Fusarium* vrste. Najzastupljenije vrste u Republici Hrvatskoj su *Fusarium graminearum, Fusarium verticilloides, Fusarium avenaceum, Fusarium subglutinans, Fusarium poae, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Fusarim culmorum i Fusarium proliferatum* (Ćosić, 2001).

Također je utvrđeno da na zrnima stabljika kukuruza prevladava *Fusarium verticilloides*, dok je na ostacima korijena kukuruza dominantan *Fusarium graminearum* (Ćosić i sur., 2004; Cvetnić i sur., 2005). Na osnovu ovog pregleda možemo zaključiti kako je *Fusarium graminearum* vrlo zastupljen u agroekološkim uvjetima Hrvatske. Ovaj fitopatogen može imati značajan učinak na smanjenje prinosa dok konzumacijom kontaminiranog usjeva dolazi do narušavanja zdravlja ljudi i životinja.

1.2. Fitopatogenost *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum kao biljni patogen vrlo je raširena plijesan u tlu, a pripada najraširenijoj toksikogenoj vrsti toga roda (IARC, 1993). *F. garminearum* napada klasove pšenice i to u godinama kada za vrijeme cvatnje i mliječne zriobe vlada velika vlaga vezana s višom temperaturom. Zaraženi klasovi gube svoju normalnu boju, te klasovi poprimaju blijedu boju, a na pljevicama se razvijaju ružičaste nakupine koje predstavljaju konidijski stadij gljive. Zrna se smežuraju i ostaju sitna, prevučena ružičastom prevlakom.

Osim paleži klasova, uzrokuje palež klice i trulež korijena, pa nastupaju štete pri klijanju. Sadržaj vode u zrnju u vrijeme žetve važan je parametar za naknadni porast plijesni. Žitarice malog zrna u pravilu se žanju kada im je sadržaj vode nizak pa se tako smanjuje mogućnost za rast plijesni.

Osim na pšenici, ovaj fitopatogen izaziva trulež stabljike i korijena kukuruznih biljaka. Uslijed napada dolazi do snižavanja prinosa, a zbog truleži stabljike mnoge se biljke polome, što otežava primjenu mehanizacije pri provedbi agrotehničkih zahvata (zaštita usjeva, berba). Možemo primjetiti da su do cvatnje biljke otporne, dok iza cvatnje počinju naglo venuti i zaostaju u rastu.

Od simptoma se uočava lišće koje je sivozelene do slamnatožute boje, površinsko tkivo korijena i međukoljenaca je izblijedilo a srčika stabljike je spužvasta, tamne boje i natrula, te često ispunjena ružičastim micelijom. Kukuruz se normalno ubire sa sadržajem vode koji potpomaže porast plijesni, pa se prije uskladištenja zrnje kukuruza u pravilu suši. Istraživanja u Hrvatskoj su pokazala češću pojavnost *Fusariuma* u godinama kada vladaju visoke temperature (iznad 25C°), uz relativnu vlažnost zraka iznad 85% (Tomasović i sur., 1991).

Zadnjih godina predmet mnogih ispitivanja i istraživanja temelji se na istraživanju ekologije patogena i efikasno smanjenje infekcije kroz agrotehničke zahvate, sjetvu otpornijih sorti (hibrida) upotrebu zaštitnih sredstava i antifugalnih agenasa (McMullen i sur., 1997; Logrieco i sur., 2003; Yuen i sur., 2007; Osborne i sur., 2007).

1.3. Mikotoksini

Gljive tijekom svog rasta i razvoja metaboliziraju primarne i sekundarne metabolite. Primarni su im metaboliti (proteini, ugljikohidrati i dr.) neophodni za životni ciklus dok neke vrste gljiva mogu sintetizirati i sekundarne metabolite (mikotoksini, antibiotici i dr.) Mikotoksini su otrovni metaboliti, a njihova biosinteza ovisit će o vrsti gljive i njihovim genetskim svojstvima. Osim toga biosinteza mikotoksina strogo je korelirana i s abiotskim uvjetima okoline (temperatura, aw, relativna vlaga zraka). Do danas je izolirano između 300 i 400 mikotoksina.

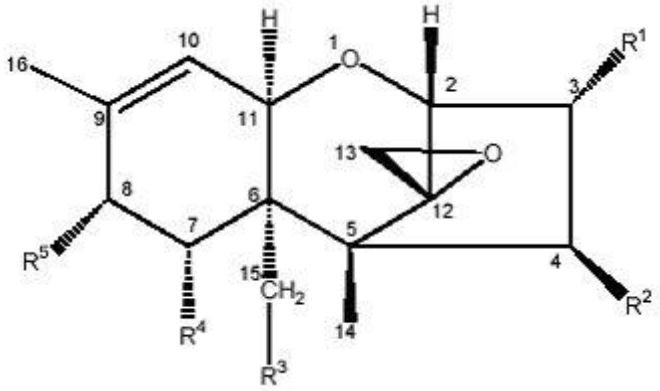
Mikotoksini uzrokuju bolest nazvanu mikotoksikoze. Valpotić i sur. 2006. utvrdili su da su svinje jedne od najosjetljivijih domaćih životinja na dugotrajnu konzumaciju kontaminirane krme s mikotoksinima. Granice od 0,3 mg deoksinivalenola i 0,2 mg T-2/HT-2 toksina kg^{-1} hrane su predložene kako bi se osiguralo izbjegavanje negativnih učinaka kod svinja. Isto tako, smjernica vrijednosti od 0,5 mg T2/HT-2 toksina i 2,5 mg DON kg^{-1} hrane su predložene u pilećoj hrani.

Kontaminacija mikotoksinima može nastati u inficiranoj biljci koja je još u polju, ali može biti nastavljena i inficirana i poslije žetve (Logrieco i sur., 2003). Prema FAO izvještajima više od 25% svjetskih poljoprivrednih usjeva je onečišćeno mikotoksinima (Pasteiner, 1997). Mikotoksini se rijetko pojavljuju pojedinačno, a dva ili više toksina zajedno mogu ispoljiti pojačan negativni učinak (Pasteiner, 1997). Sušenje i mljevenje žitarica pod visokim tlakom i temperaturom može smanjiti količinu gljivica, ali ne i mikotoksina koji su otporni na temperature prilikom obrade, te mogu opstati u krmivima bez dokaza onečišćenja gljivicama (Osweiler, 1992). Naime većina mikotoksina je kemijski stabilna pa se mogu održati dugo vremena nakon nestanka gljivica (Pasteiner, 1997).

Gledano sa zdravstvenog i agroekonomskog stajališta bolesti koje se povezuju s mikotoksinima možemo podjeliti na: aflatoksine, citrinine, ergot alkaloide, fumonozine, ohratoksine, trihotecene i zearalenon (Hussein i Brasel, 2001.). Simptomi vezani uz mikotoksine ovise o koncentraciji i dužini izlaganja mikotoksina, o vrsti mikotoksina, vrsti, spolu, starosti i zdravstvenom stanju životinje (Kosalec i sur., 2004).

1.3.1. Trihoteceni

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, Stachybortis, Trichoderma, Trichothecium* i drugi (Hussein i sur., 2001; Bennett i sur., 2003). Oni posjeduju tetraciklički 12,13 epoksitrihotecenski kostur (Slika 1) (WHO, 1990).



Slika 1: Kemijska struktura trihotecena tipa A i B
(Izvor: www.food-info.net)

Trihoteceni su kvalificirani kao makrociklički i nemakrociklički. Nemakrociklički trihoteceni su najčešći i dijele se na grupe: tip A uključuje diacetoksiscirpenol, neozolaniol, T-2 toksin, toksin HT-2 koji maju vodik ili ester na C-8 poziciji, 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). Treća grupa koja ima drugi epoksidni prsten na C-7, 8 ili C-9, 10 i toksini četvrte skupine (tip D) sadrže makrociklički prsten između C-4 i C-15 s dvije ester veze (Eriksen, 2004).

Procjenjeno je da je 25% svjetskih usjeva pogođeno mikotoksinima (Charmley i sur., 1995), ali za neke *Fusarium* toksine kao što su deoksinivalenol (DON) i fumonozin B1 vjerojatno je taj postotak još i veći (Bullerman, 1996, Eriksen i Alexander 1998). DON i derivati su odgovorni za najmanje 35 prijavljenih toksikoza od 1961. godine u ruralnim područjima Indije, Kine i Japana (Ehling i sur., 1997). Na primjer, u Poljskoj visoka incidencija stope kontaminacije DON-om na kukuruzu ide do neprihvatljive visoke vrijednosti (do 927 mg kg^{-1}), dok je potencijalno štetna razina DON-a do 40 mg kg^{-1} (Placinta i sur. 1998).

Trihoteceni uzrokuju različite učinke na laboratorijske i domaće životinje, uključujući upalu kože, probavne smetnje, hemolitičke poremećaje, umanjene vrijednosti staničnog imunološkog odgovora (IARC, 1993; Rotter i Prelusky, 1996a). Djeluju na stanicu tako što dovode do inhibicije proteina i sinteze DNA i RNA, inhibiraju funkcije mitohondrija, dijeljenja stanice i djelovanje membrane (Rocha i sur., 2005).

Iz globalne perepektive, može se smatrati kako, tri skupine *Fusarium* mikotoksina imaju osobitu važnost po zdravlje životinja i njihovu produktivnost. Unutar trihotecenske skupine deoksinivalenol je široko povezan sa odbacivanjem hrane u svinja, dok T-2 toksin može izazvati reproduktivne poremećaje u krmača. Druga skupina obuhvaća zearalenon i derivate, dok treća skupina uključuje fumonizine koji su povezani s određenim toksičnim sindromom, kao što je konjska leukoencefalomalacija (ELEM) i plućni edem kod svinja.

Maksimalne podnošljive koncentracije nekih *Fusarium* toksina za proizvode načinjene od pšenice i kukuruza su propisane od strane nacionalnih i Europskih zakonodavnih institucija za zaštitu potrošača i zdravstvenih rizika povezanih s unosom mikotoksina (FAO, 2004).

1.4. Optimalni uvjeti za rast *Fusarium* sp.

Sadržaj slobodne vode (aw vrijednost) i temperatura najbitniji su okolišni parametri koji određuju rast plijesni i kontaminaciju mikotoksinima. Aktivitet vode se definira kao odnos parcijalnog tlaka vodene pare iznad čiste vode pri istoj temperaturi i predstavlja onaj sadržaj vlage koji može biti izmjenjen 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 aktivitet vode (aw). Prema istraživanjima Ramirez i sur. 2006., optimalni uvjeti za rast *Fusarium graminearum* na ozračenom zrnu pšenice su 25°C i aw 0,995 dok je razina DON-a bila najveća pri aw 0,995 i 30°C.

Abiotski uvjeti imaju bitnu ulogu u fungalnoj kolonizaciji u periodu prije i poslije žetve zrno kukuruza sadrži oko 40-50% vode (aw=1), a sazrijevnjem zrna taj sadržaj se smanjuje na 20-25% (aw=0,90-0,95). Osim ovih uvjeta, ne treba zanemariti ni interakciju u uskladištenom zrnu uslijed različitih okolišnih parametara (Marin i sur., 1998b).

1.5. Prevencija razvoja mikotoksina

Razvoj preventivnih strategija nastanka mikotoksina bazira se na HACCP pristupu tj. identificiranju ključnih kritičnih kontrolnih točaka prije i poslije žetve.

Predžetvena strategija prevencije nastanka mikotoksina u žitaricama obuhvaća: sjetvu otpornijih sorti (hibrida), poštivanje plodoreda, kultivacija tla, unošenja žetvenih ostataka u tlo, pravilno navodnjavanje, izbalansirana gnojidba.

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).

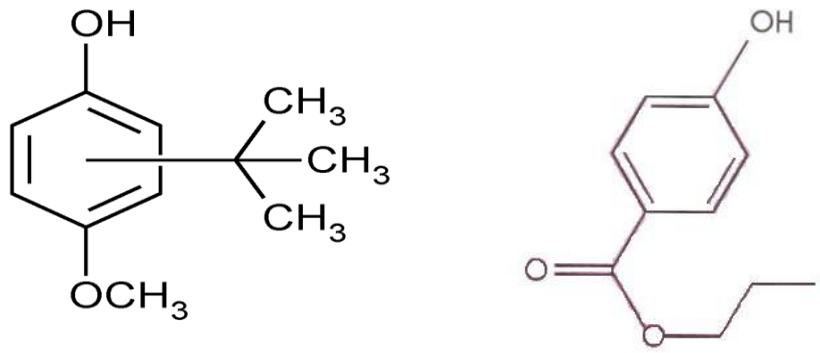
Posliježetvena strategija uključuje smanjenje vremena od žetve (berbe) do sušenja, zatim efikasno sušenje zrna na ≤14% vlage, učinkovitu higijenu skladišta, odsustvo štetočina (Magan i sur., 2007), korištenje prikladnih konzervansa u prevenciji nastanka mikotoksina (Kabak i sur., 2006) i dr. Višegodišnjim 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_2 na >75% kako se ne bi pojavile mikotoksikogene plijesni u djelomično osušenom zrnu (Magan i sur., 2007). Primjena fungicida i herbicida također se iskorištava u cilju prevencije rasta plijesni i bosinteze mikotoksina (Kabak i sur., 2006).

1.5.1. 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).

1.5.1.1. Sintetski antioksidansi

Sintetski antioksidansi kao što su butilirani hidroksianisol, propil paraben i drugi su u širokoj upotrebi kao antioksidansi hrane (Slika 2) (Balasundram i sur., 2006).



Slika 2: Strukturne formule butiliranog hidroksianisola i propil parabena (Izvor: www.drugfuture.com)

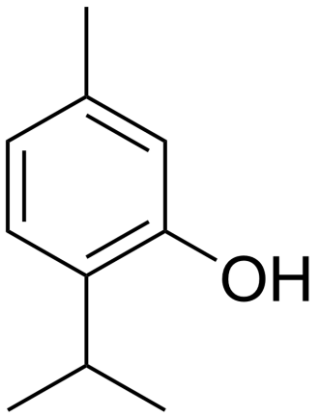
Butilirani hidroksianisol dovodi do oštećenja stanične micelijske membrane što rezultira pojačanim istjecanjem šećera, aminokiselina i proteina iz fungalne stanice *Fusarium* sp. (Thompson, 1996). Nadalje, smatra se da butilirani hidroksianisol (BHA) i propil paraben (PP) remete transport protona preko mitohondrijske i stanične membrane, te time i proizvodnju energije i transport supstrata (Etcheverry i sur., 2002; Aldred i sur., 2008). 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 smjesama je dozvoljeno dodavati antioksidans E320 (butilirani hidroksianisol) i to u koncentraciji od najviše 150 ppm pojedinačno ili u smjesi.

1.5.1.2. Prirodni antioksidansi

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 prošlog stoljeća. Eterična ulja imaju niz prednosti jer njihovo prirodno podrijetlo označava 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). Antifungalnu aktivnost pokazuju eterična ulja koja sadrže fenolnu komponentu, a to su oksigenirani monoterpeni (timol, karvakrol, citral) te fenolni benzenski derivati (eugenol), dok alilni alkoholi posjeduju nešto slabiju antioksidativnu aktivnost (nerol, geraniol) (Slika 3) (Ruberto i sur., 2000). Prisutnost pristupačnog vodikovog atoma fenola i/ili alilne skupine predstavlja dobru barijeru protiv oksidativnih procesa (Ruberto i sur., 2000).



Slika 3: Strukturna formula timola
(Izvor: www.food-info.net)

Ćosić i sur. 2004. testirali su utjecaj jedanaest vrsta eteričnih ulja (klinčićevac, ružmarin, list cimeta, kadulja, bor, gorka naranča, metvica, anis, kim, lavanda, timijan) na porast micelija dvanaest fitopatogenih gljiva (*Fusarium graminearum, F. verticillioides, F. subglutinans, F. oxysporum, F. avenaceum, Diaporthe helianthi, Diaporthe phaseolorum var. caulivora, Phomopsis longicolla, P. viticola, Helminthosporium sativum, Colletotrichum coccodes, Thanatephorus cucumeris*). Sva eterična ulja koja su koristili, izuzev ulja bora i gorke naranče, pokazala su određeno inhibitorno djelovanje prema nekim ili svim istraživanim gljivama. Najbolje antifungalno djelovanje imala su ulja timijana, lista cimeta, klinčićevca i anisa. U usporedbi s kontrolom, ulja bora, gorke naranče i kadulje pozitivno su utjecala na porast micelija nekih gljiva.

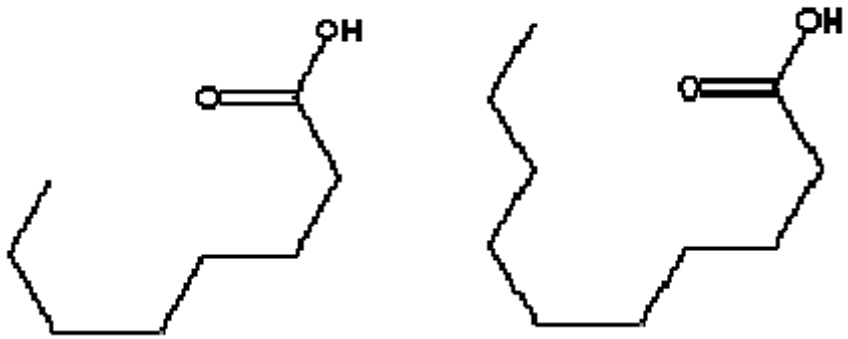
Utvrđen je i fungicidan učinak timola i karvakrola na fungalnu stanicu stvaranjem lezija na citoplazmatskoj membrani (Pina-Vaz i sur., 2004; Pinto i sur., 2006). Transmisijskom elektronskom mikrografijom utvrđeno je kako niže koncentracije timola (1 g L^{-1}) uzrokuju dezorganizaciju staničnih organela fungalnih konidija i hifa, dok veće koncentracije (8 g L^{-1}) dovode do gubitka stanične strukture i organizacije (Svircev i sur., 2007).

Ćosić i sur., 2004. istražili su interakciju hranjivih podloga i rast kolonije, te utvdili kako sadržaj hranjivih podloga ne utječe na porast gljiva. Vrsta hranjive podloge mnogo više utječe na bujnost zračnog micelija, iako izgled i kompaktnost micelija nije rezultat samo supstrata na kojem se gljiva razvija, već i karakteristika same vrste.

Osim prirodnih antioksidanasa prihvatljiva je i biološka metoda koja je istražena kao dodatni ili alternativni način kontroliranja *Fusariuma*. Neurozian i sur. 2006. procijenili su inhibitorni potencijal bakterija *Pseudomonas fluorescens, B. subtilis* i *Streptomyces* sp. na biološku kontrolu *F. graminearum*. Svi testirani bakterijski antagonisti inhibirali su micelijski rast *F. graminearum*. Međutim, bilo je značajne razlike među sojevima bakterija. Rast inhibicije *F. graminearum* tretiran s *P. fluorescens* bio je znatno veći nego od drugih sojeva, dok je soj *B. subtilis* imao manji utjecaj na rast patogena. Antifungalna aktivnost soja *Streptomyces* imala je manji utjecaj od drugih. Pokusima su svi testirani bakterijski izolati sputali rast *F.graminearum*. Reziltat inhibicije može biti zbog inhibitornog učinka tvari koje proizvode bakterije, koje potiskuju rast *F. graminearum*, dok je druga mogućnost, da bakterijski izolat iscrpljuje hranjivi agar koji ih okružuje i na taj način inhibira rast *F. graminearum*.

1.5.2. Masne kiseline

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). Izvori masnih kiselina mogu biti prirodnog podrijetla: kokosovo ulje sadrži 4,9% oktanske i 6,2% dekanske kiseline (Ghosh i sur., 1997), dok ulje muškatnog oraščića sadrži 46% tetradekanske, 11% oktanske i 5% dekanske kiseline (Slika 4) (Spricigo i sur., 1999).



Slika 4: Strukturne formule oktanske i dekanske kiseline
(Izvor: www.chemicalland21.com)

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). 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. Hidrofobne grupe zasićenih masnih kiselina igraju bitnu ulogu.

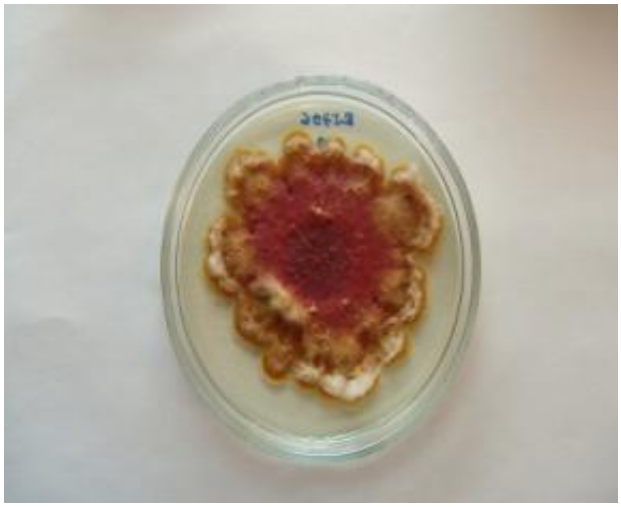
Europska komisija registrirala je masne kiseline (npr. oktanska, dekanska, dodekanska, tetradekanska kiselina, i dr.) kao poboljšivače okusa u hrani i smatra se kako ne predstavljaju opasnost za javno zdravlje (Official Journal of the European Communities No 217/1999; 32/2002).

2. MATERIJAL I METODOLOGIJA RADA

Uskladištenjem krmnih smjesa u silosima i skladištima može doći do povećanja vlažnosti i temperature u uskladištenom materijalu. Ovim pokusom simulirana je takva situacija. Ispitan je učinak smjesa antifungalnih tvari, različitih koncentracija, koje su umješane u krmne smjese nakon čega je provedena umjetna inokulacija istih s vrstom *Fusarium graminerum.* Svakodnevno je praćen porast kolonija na krmnim smjesama.

2.1. Čista kultura roda *Fusarium graminearum*

U istraživanju je korišten izolat *Fusarium graminearum* Schwabe 110250 (Centralbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska) s dobrom sposobnošću biosinteze trihotecena tipa B (Slika 5). Čista kultura roda *Fusarium graminearum* uzgojena je na petri pločama na krumpir – dekstroznom agaru (Biolife) na temperaturi od 25°C ± 1°C tijekom pet dana.



Slika 5. Čista kultura *Fusarium graminearum*
(Izvor: G. Kanižai Šarić)

2.2. Krmne smjese

Stočna hrana korištena kao supstrat obuhvatila je smjesu za tov pilića u porastu (PPT-2) i krmnu smjesu za krmače dojilje i neraste (SK-D-N) koja je sterilizirana gama zrakama od 12 kGreya. Sastav ovih krmnih smjesa prikazan je na tablicama 1 i 2. Početni sadržaj vlage u stočnoj hrani PPT-2 bio je 11,06% (aw=0,632), a u stočnoj hrani SK-D-N 12,09% (aw=0,619). Željeni aktivitet krmnih smjesa (aw 0,98) određen je prema krivulji adsorpcije vlage za svako krmivo. Aktivitet vode u smjesi je provjeravan s uređajem za mjerenje aktiviteta vode (HygroPalm AW1, Rotronic).

Tablica 1: Sastav krmne smjese PPT-2

PPT-2	**% SMJESE**
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 2: Sastav krmne smjese SK-D-N

SK-D-N	**% SMJESE**
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

2.3. Antioksidansi i masne kiseline

U istraživanju su ispitani:

1. Sintetski antioksidansi: butilirani hidroksianisol (BHA) i propil paraben (PP)
2. Prirodan antioksidans tj. sastojak eteričnog ulja: timol (T)
3. Masne kiseline: oktanska (C8) i dekanska (C10)

2.4. Priprema smjese antioksidanasa i masnih kiselina

Antioksidansi i masne kiseline su odvagani na analitičkoj vagi u sterilnom uvjetima i otopljeni u deioniziranoj vodi, 95% alkoholu i 10% Tweenu 80 (9:2:2), nakon čega su umješani u stočnu hranu. Koncentracije antifungalnih tvari za krmnu smjesu PPT–2 iznosile su 100, 150, 200 ppm svakog od antioskidanasa (BHA, T i PP) ili po 150 ppm ovih tvari uz dodatak 400 ppm C8 i 400 ppm C10. Za krmnu smjesu SK-D-N ispitana smjesa je sadržavala po 200 ppm BHA, T i PP uz po 400 ppm C8 i C10. Kontrolne probe su sadržavale krmne smjese i vodu.

2.5. Inokulacija krmnih smjesa

Nakon 48 sati uravnoteženja vlage, stočna hrana je razvagana (Slika 6) u petri ploče te inokulirana micelijskim diskom promjera 7 mm čiste kulture *Fusarium graminearum* (Slika 7) poraslom na krumpir - dekstroznom agaru (BioLife).



Slika 6. Vaganje krmnih smjesa

(Izvor: G. Kanižai Šarić)



Slika 7. Inokulacija micelijskim diskom čiste kulture
(Izvor: G. Kanižai Šarić)

2.6. Inkubacija krmnih smjesa

Petri ploče su inkubirane pri 25ºC ± 0,2°C u okruženju iste relativne vlažnosti kao i krma. Sve probe sadržavale su tri ponavljanja. Svakodnevno je praćen porast plijesni na krmnoj smjesi izmjeravanjem dva promjera kolonije pod pravim kutom (Slika 8), dok kolonija nije dosegla rub petrijeve zdjelice. Fungalni porast je korišten za računanje stope rasta (mm/po danu) uz primjenu linarne regresije.



Slika 8. Izmjeravanje promjera kolonije
(Izvor: G. Kanižai Šarić)

2.7. Određivanje mikotoksina

Nakon što je kolonija dosegla rub petrijeve zdjelice, uzorci su osušeni na 50°C tijekom 48 sati te usitnjeni do veličine čestica od 0,08 mm. Uzorci su čuvani na – 20°C do konačne analize mikotoksina. Postupak pripreme uzoraka za analizu mikotoksina uključivao je ekstrakciju i prečišćavanje kolonama (MultiSep 227 Trich+ kolone, Romer Labs).

2.7.1. Analiza trihotecena tipa B

Određivanje trihotecena tipa B uključilo je ekstrakciju iz uzorka (Slika 9), 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.

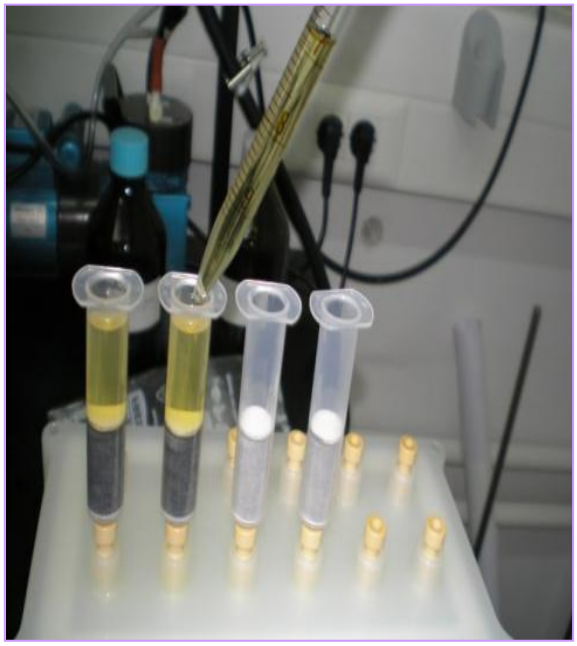


Slika 9: Analiza mikotoksina: ekstrakcija iz uzorka

(Izvor: G. Kanižai Šarić)

2.7.1.1. Prečišćavanje SPE kolonama

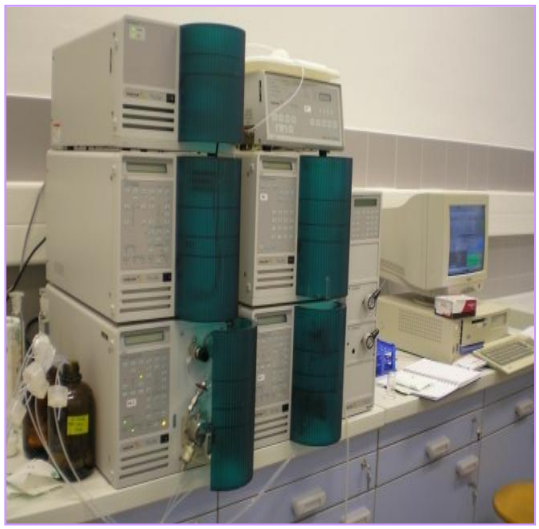
MultiSep 227 Trich+ (Romer Labs) kolone sadrže kombinaciju adsorbensa koji zadržavaju nečistoće, dok trihoteceni tipa A i B prolaze. Uzorak za analizu je samljeven da 95% uzorka prolazi kroz sito od 20 m. Zatim je odvagano 6 g uzorka, u odvagu je dodano 100 ml smjese acetonitrila i vode (84+16, v+v), 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.



Slika 10: Prečišćavanje kolonama
(Izvor: G. Kanižai Šarić)

2.7.2. 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.



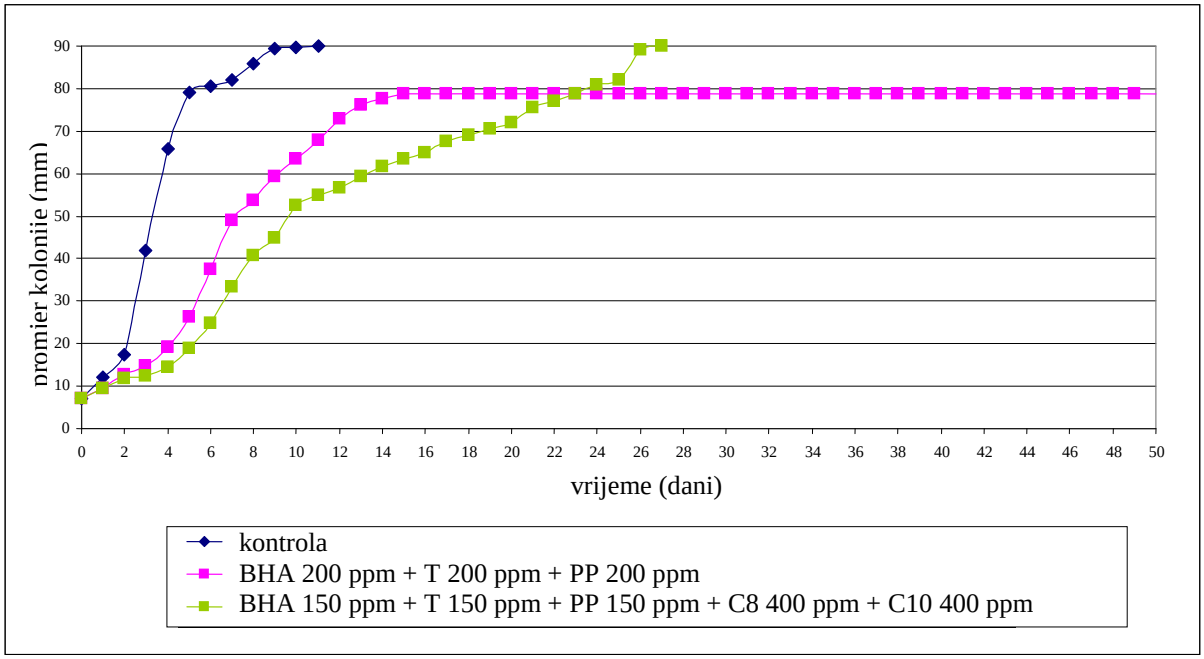
Slika 11: Analiza HPLC-om
(Izvor: G. Kanižai Šarić)

2.8. 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). 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).

3. REZULTATI

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

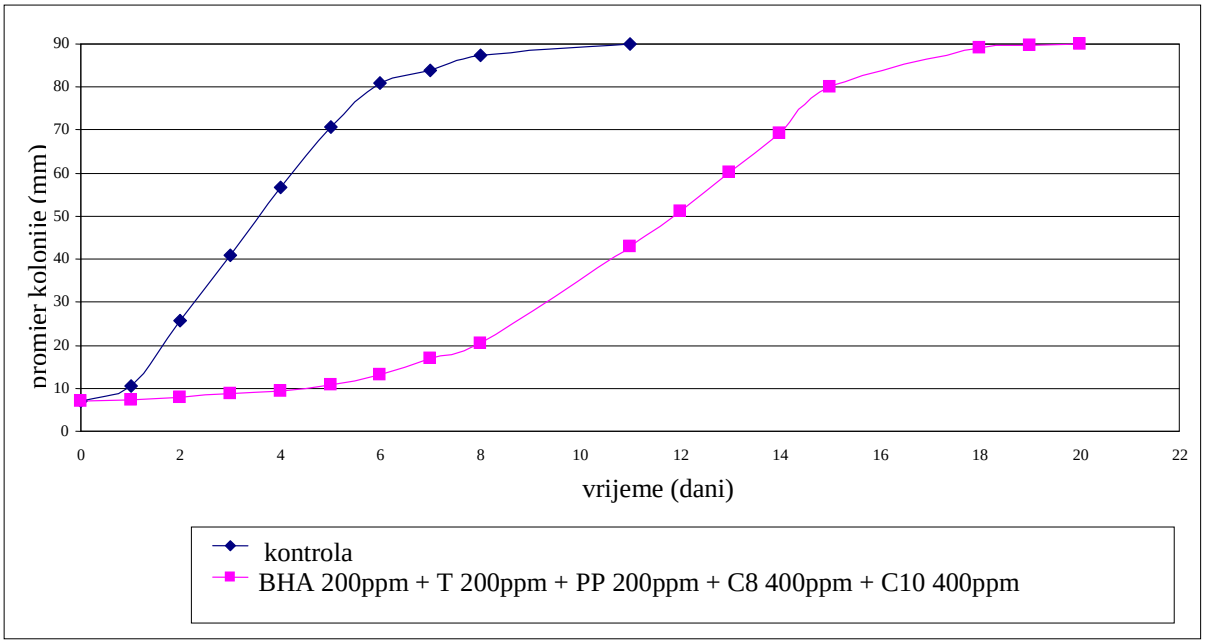


Slika 12. Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu PPT-2 tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

Tablica 3: 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^{-1})
Kontrola		0	8,3
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben	200+200+200	1	5,0
kombinacija 2 butilirani hidroksianisol + timol + propil paraben + oktanska kis. + dekanska kis.	150+150+150+400+400	1	3,1

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



Slika 13. Dnevni rast *Fusarium graminearum* na krmivu SK-D-N tretiranom s različitim kombinacijama tvari pri aw 0,98 i 25°C

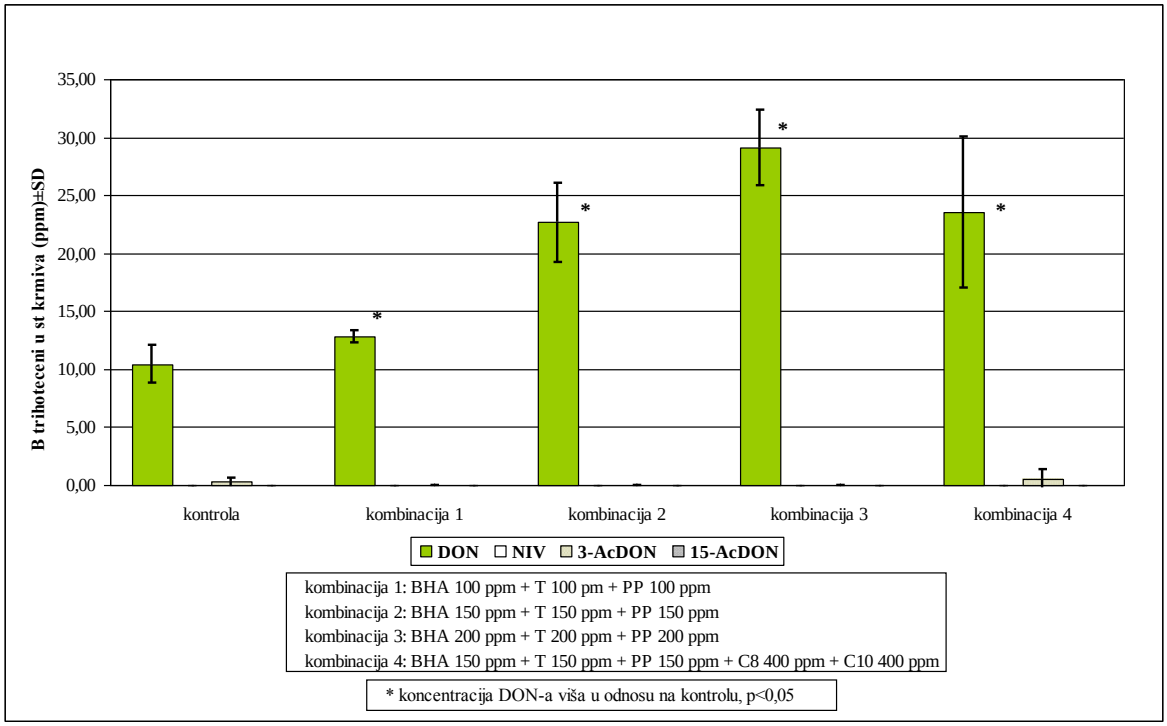
Tablica 4: Utjecaj antifungalnih kombinacija i koncentracija na rast *Fusarium graminearum* na krmivu SK-D-N pri aw 0,98 i 25°C

kombinacije antifungalnih tvari	koncentracija (ppm)	lag faza (dani)	stopa rasta (mm dan^{-1})
Kontrola		1	8,9
kombinacija 1 butilirani hidroksianisol + propil paraben + timol + oktanska kis. + dekanska kis.	200+200+200+400+400	4	5,0

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

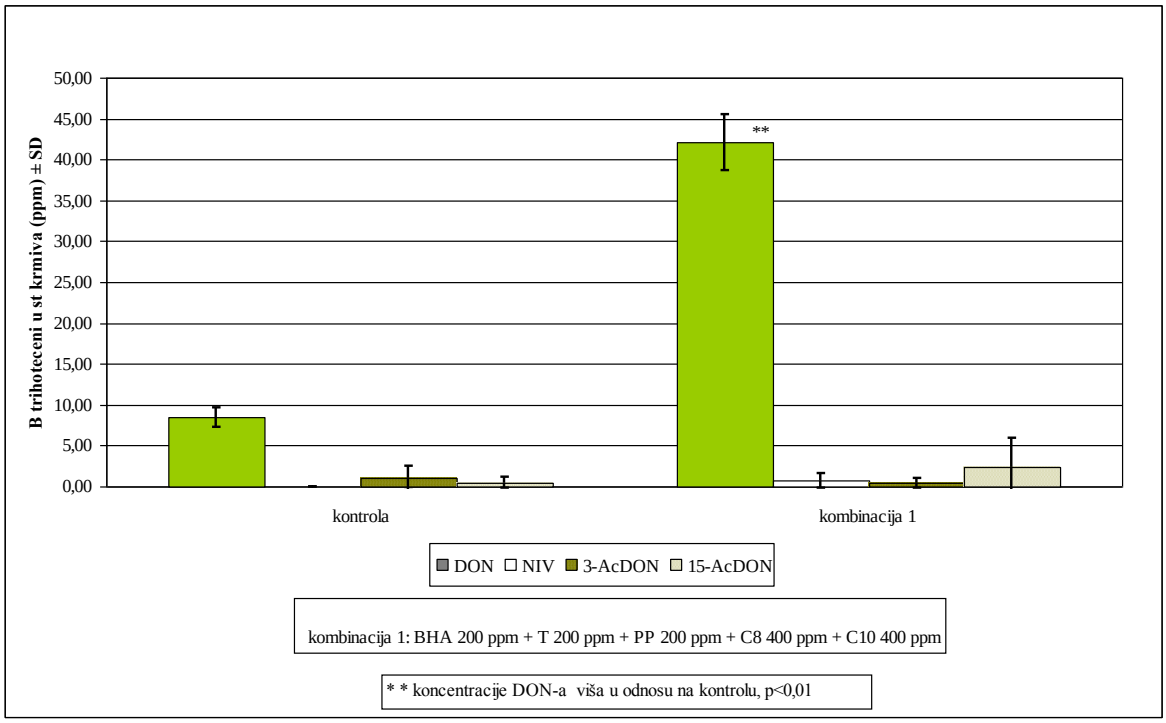
Sadržaj trihotecena tipa B određen je u različitim kombinacijama i koncentracijama antioksidanasa i masnih kiselina u krmnim smjesama.

3.3.1. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi PPT-2



Slika 14. Koncentracije B trihotecena u suhoj tvari krmiva PPT-2 uz odabrane kombinacije tvari pri aw 0,98

3.3.2. Trihoteceni tipa B u krmnoj smjesi SK-D-N



Slika 15. Koncentracije B trihotecena u suhoj tvari krmiva SK-D-N uz odabrane kombinacije tvari pri aw 0,98

4. RASPRAVA

Najbolja preventiva mikotoksikoza je korištenje zdravih i kvalitetnih sirovina u proizvodnji hrane za životinje. Ovom preventivnom mjerom povećava se sigurnost, hranjiva vrijednost i kakvoća proizvoda životinjskog podrijetla u ljudskoj prehrani. Kako bih dobili što veću sigurnost, potrebno je kontinuirano analitičko ispitivanje sirovina i gotovih proizvoda. Ovim postupcima unaprijedili bi smo svoju proizvodnju i izbjegli ekonomske gubitke.

4.1. Učinkovitost kombinacija i koncentracija antifungalnih tvari na rast *Fusarium graminearum*

Prva ispitana smjesa tvari na krmivu PPT-2 pri aw 0,98 prikazana je u Tablici 3. Kombinacija 1. imala je produženu lag fazu od 1 dan u odnosu na kontrolu (Slika 12), te je ovom kombinacijom promjer kolonije dosegao 80 mm i doveo do daljne stagnacije rasta kolonije. Kombinacija 2. koja je osim prirodnih i sintetskih antioksidanasa sadržavala i masne kiseline (Slika 12), imala je produženu lag fazu u trajanju od jednog dana u odnosu na kontrolu, te je promjer kolonije dosegao 90 mm. 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.

Druga ispitana smjesa tvari na krmivu SK-D-N pri aw 0,98 priikazana je u Tablici 4. Ispitana kombinacija imala je produženu lag fazu od 4 dana u odnosu na kontrolu (Slika 13), te je nakon lag faze došlo do povećanja promjera kolonije. Ispitana kombinacija antifungalnih tvari nije bila dovoljno učinkovita u inhibiciji rasta *F. graminearum*. Ispitane smjese tvari nisu učinkovite najvjerojatnije zbog nedovoljne primijenjene koncentracije.

Na krmivu PPT-2 lag faza traje kraće od kontrole u odnosu SK-D-N lag fazu koja traje duže. 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.

4.2. Trihoteceni tipa B u krmnim smjesama

Nijedna ispitana kombinacija antifungalnih tvari nije učinkovito inhibirala sintezu B trihotecena (Slika 14) na krmivu PPT-2. Ove antifungalne tvari nisu bile dovoljno inhibitorne ni u redukciji radijalnog rasta *F. graminearum* koji se kretao od 4,2 do 5,0 mm po danu što je u prosjeku 39-46% kontrolnog rasta. 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 ($p<0,05$).

Na krmnoj smjesi SK-D-N ispitana kombinacija antioksidanasa s masnim kiselinama stimulira sintezu DON-a, pri čemu su utvrđene statistički značajne razlike između ispitane kombinacije i kontrole ($p<0,01$) (Slika 15). Ispitane smjese očigledno vrlo stresno utječu na *Fusarium graminearum*. Antifungalni agensi nisu bili učinkoviti niti u smanjenju radijalnog rasta koji je iznosio 5 mm dnevno što iznosi 56% kontrolnog rasta. Značajnu ulogu vjerojatno ima oksidativni stres koji izazivaju velike doze primijenjenih antioksidansa, a koji rezultira stimuliranom biosintezom DON-a.

Sastav krmnih smjesa ne utječe značajno na koncentraciju B trihotecena. Krmna smjesa PPT-2 po svom sastavu (51% kukuruza, 40% soje) je masnija (21% bjelančevina, 6% masti) za razliku od krmiva SK-D-N koji po sastavu sadrži 46% kukuruza, 15% ječma i 15% soje (15% bjelančevina, 3% masti) koje je manje masno. Koncentracija B trihotecena je na krmnoj smjesi PPT-2 manja pri istim primijenjenim ispitivanim tvarima nego na krmivu SK-D-N što bi se moglo objasniti boljom dispergiranosti lipofilnih sastojaka antifungalnih smjesa (BHA i T) u masnijem krmivu.

5. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem o utjecaju smjesa tvari antioksidansa i masnih kiselina na inhibiciju rasta *Fusarium graminearum* i inhibiciju sinteze trihotecena tipa B na krmnim smjesama, možemo zaključiti da ove antifungalne smjese pri većoj vlažnosti supstrata (aw 0,98) nemaju inhibitoran učinak na rast *F. graminearum.* Antifungalni agensi nisu bili učinkoviti niti u smanjenju radijalnog rasta ove mikotoksinogene plijesni. Obje ispitane krmne smjese stimuliraju biosintezu trihotecena tipa B i to uglavnom deoksinivalenola, uz statistički značajnu razliku između ispitanih kombinacija i kontrole. Značajnu ulogu vjerojatno ima oksidativni stres koji izazivaju određene doze primijenjenih antioksidansa.

Daljnja ispitivanja bi trebala obuhvatiti i utjecaj antioksidanasa i masnih kiselina na kvalitetu proizvoda animalnog podrijetla i prihvatljivost takvih krmiva domaćim životinjama. Pravilnik o kakvoći stočne hrane dopušta da se krmnim smjesama mogu dodavati mirisna sredstva i sredstva za poboljšanje okusa prirodnog podrijetla, a u ovu kategoriju bi se mogao svrstati i timol, kao frakcija eteričnog ulja majčine dušice ili origana. Također, Europska komisija registrirala je masne kiseline kao poboljšivače okusa u hrani i smatra se kako ne predstavljaju opasnost za javno zdravlje.

Ispitane smjese antifungalnih i antimikotoksikogenih tvari manje su toksične, financijski su povoljnije, a posjeduju i antioksidativno djelovanje te ujedno štite stočnu hranu od kvarenja.

6. POPIS LITERATURE

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Review 16: 497-516.

5. Bergsson G, Arnfinnsson J, Steinggrímsson O, Thormar H. 2001. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45: 3209-3212.

6. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. CMI, Kew, Surrey, London.

7. Branen AL, Davidson PM, Katz B. 1980. Antibacterial properties of phenolic antioxidants and lipids. Food Technology 34: 42-63.

8. Bullerman, L.B. 1996. Fumonisins in food. Plenum Press, New York, 103: 296-328

9. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253.

10. Chadeganipour M, Haim A. 2001. Antifungal activities of pelargonic and capric acid on *Microsporum gypseum*. Mycoses 44: 109-112.

11. Chakaeva, S.A. 2000. Fusariosis of agricultural cereals in Kyrgizstan. Abstracts, 74-75. 6thEuropean Fusarium Seminar, Berlin, Germany.

12. Charmley L.L., Trenholm H.L., Prelusky D.B., and Rosenberg A. 1995. Economic losses and decontamination. Natural Toxins, 3, 199-203.

13. Creppy EE. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters 127: 19–28.

14. Ćosić J. 1997. *Fusarium* spp. na pšenici i otpornost nekih genotipova na palež klasova. Magistarski rad. Sveučilište J. J. Strossmayera, Osijek.

15. Ćosić D. 2001. Taksonomija *Fusarium* vrsta izoliranih s kultiviranog bilja, korova i njihova patogenost za pšenicu. Doktorska disertacija. Sveučilište J. J. Strossmayera, Osijek.

16. Ćosić J, Jurković D. 2001. *Fusarium* vrste s različitih domaćina i njihova patogenost za klijance pšenice. Poljoprivreda 7: 5-10.

17. Ćosić J, Vrandečić K, Svitlica B. 2004. *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. Poljoprivreda 10: 9-14.

18. 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.

19. Ćosić J, Vrandečić K, Postić J, jurković D, Ravlić M 2010: In vitro antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. Poljoprivreda 16: 25-28

20. 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.

21. Diaz de Ackermann, M., Kohli, M.M. 1996. Research on *Fusarium* Head Blight of Wheat in Uruguay. In *Fusarium* Head Scab: Global Status and Future Prospects, Proceedings of a Workshop Held at CIMMYT, 13-18.

22. Ehling, G., Cockburn, A., Snowdon, P. and Buchhaus, H., 1997, The significance of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) for human and animal health, Cereal Research Commun 25: 433-447.

23. Eriksen GS, Alexander J (eds.), 1998. *Fusarium* toxins in cereals risk assessment. Nordic Council of Ministers; TemaNord 1998: 502, pp. 7-27 and 45-58; Copenhagen.

24. Eriksen GS, Pettersson H. 2004a. Toxicological evaluation of trichotecenes in animal feed. Animal Feed Science and Technology 114: 205-239.

25. 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.

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

27. 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.

28. Hill, J.P., Fernandez, J.A., McShane, M.S. 1983. Fungi Associated with Common Root Rot of Winter Wheat in Colorado and Wyoming. Plant Disease 67:795-797.
29. Hussein HS, Brasel JM. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 167:101-134.
30. 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.
31. Jurković, D. 1981. Proučavanje biologije i ekologije važnijih *Fusarium* vrsta kao uzročnika truleži korijena i stabla kukuruza na području Baranje. Doktorska disertacija.
32. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. 1972. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2: 23-28.
33. Kanižai, Š. G. 2010. Utjecaj smjesa antioksidanasa i masnih kiselina na rast *Fusarium* sp. producenta trihotecena i fumonizina u krmnim smjesama. Doktorska disertacija. Sveučilište J.J. Strossmayera. Osijek
34. Kommedahl, T., Windels, C.E., Stucker, R.E. 1979. Occurence of *Fusarium* Species in Roots and Stalks of Symptomless Corn Plants During the Growing Season. Phytopathology 69:961-966.
35. Kosalec I, Pepeljnjak S. 2004. Najznačajniji mikotoksini i mikotoksikoze. Praxis Veterinaria 52: 169-181.
36. Kryuchkova, L., Dragovoz, I., Yavorska, V., Raichuk, L. 2002. *Fusarium* species in wheat grains in the Ukraine. J. Appl. Genet. 43A:177-184.
37. Leslie, J.F., Pearson, C.A.S., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. Phytopathology 80:343-350.
38. Logrieco A, Bottalico A, Mulé G, Moretti A, Perrone G. 2003. Epidemology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins from some Mediterranean crops. European Journal of Planth Pathology 109: 645-670.
39. 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.
40. Miedaner, T. 1997. Breeding Wheat and Rye for Resistance to Fusarium Diseases. Plant Breeding, 116(3):201-220.

41. Miguel MG, Falcato-Simıes 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.

42. Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM. 2006. Food Mycotoxins: An Update. Journal of Food Science 71: 51-65.

43. Narodne novine. 1998. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva: Pravilnik o kakvoći stočne hrane br. 26/98. Službeni list Republike Hrvatske.

44. 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.

45. Osweiller, G. D. 1992. Mycotoxins. U: Diseases of Swine. Seventh edition (Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., Allaire, S.D., i Taylor, D.J., eds.). Wolfe Publishing, London. 735-743.

46. 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.

47. Pasteiner, S. 1997. Coping with mycotoxin contaminated feedstuffs. Feed International, May. 12-16.

48. 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.

49. 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.

50. 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 irradited wheat grain. International Journal of Food Microbiology 106: 291-296.

51. 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.

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

53. 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.
54. Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. 1996a. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). Journal of Toxicology and Environmental Health 48: 1-31.
55. Ruberto G, Baratta MT. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry 69: 167-174.
56. Salobir J, Frankič T. 2007. Antioksidanti - važnost za životinje i potrošače. XV međunarodno savjetovanje- Krmiva, Opatija 2-5 lipnja. Zbornik sažetaka: 13.
57. 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.
58. Soriano JM, Dragacci S. 2004. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. Food Resaerch International 37: 367-374.
59. Snijders, C.H.A. (1990): Systemic Fungal Growth of *Fusarium culmorum* in Stems of Winter Wheat. Phytopathology, 129:133-140.
60. 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.
61. Stoloff, L. 1976. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. Adv. Chem. Ser. 149, 23-50. Am. Chem. Soc., Washington, D.C. 20204
62. Svircev AM, Smith RJ, Zhou T, Hernadez M, Liu W, Chu, CL. 2007. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastracture of Monilinia fructicola. Postharvest Biology and Technology 45: 228–233.
63. Thompson DP. 1996. Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. Journal of Food Protection 59: 412-415.
64. Thormar H, Isaacs CE, Brown HR, Barshatzky MR, Pessolano T. 1987. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. Antimicrobia Agents and Chemotherapy 31: 27-31.
65. Tomasović S, Vlahović V, Matijašević M, Sesar B. 1991. Oplemenjivanje pšenice na otpornost prema fuzariozama klasa (palež klasa). Sjemenarstvo 2: 67-76.
66. 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.

67. Valpotić H., Šerman V. 2006. The Influence of mycotoxins pig health and performance. Veterinarski fakultet, Zagreb, Krmiva 48, 1; 33-42

68. 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 B1 production by *Fusarium verticillioides* in maize. Journal of the Science of Food and Agriculture 84: 1141-1146.

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

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

71. Windels, C.E., Kommedahl, T., Stienstra, W.C., Burnes, P.M. (1988): Occurence of *Fusarium* Species in Symptom-Free and Overwintered Cornstalks in North-western Minnesota. Plant Disease 72:990-993.

7. SAŽETAK

Fusarium graminearum je mikotoksikogena plijesan koja se javlja kao kontaminant žitarica na polju i skladištima. Osim nastale ekonomske štete, bitne su i zdravstvene posljedice koje izazivaju B trihoteceni, mikotoksini koje sintetizira *F. graminearum*. U cilju smanjivanja kontaminacije ovim fitopatogenom ispitali smo utjecaj antifungalnih smjesa koje sadržavaju sintetske, prirodne antioskidanse i masne kiseline na gotovoj stočnoj hrani. Ispitane mješavine tvari obuhvatile su butilirani hidroksianisol, propil paraben, timol, oktansku i dekansku kiselinu u različitim kombinacijama i koncentracijama. Nijedna ispitana kombinacija antifungalnih tvari nije bila učinkovita u inhibiciji radijalnog rasta *Fusarium graminearum* kao niti u sintezi B trihotecena. Ispitane smjese očigledno vrlo stresno utječu na *F. graminearum* što rezultira stimuliranom sintezom deoksinivalenola.

8. SUMMARY

Fusarium graminearum is mycotoxinogenic mould that occurs as a contaminant of cereals in the fields and warehouses. Apart from resulting economic damages are significant and the health effects caused by B trichothecenes, mycotoxins synthesized by *F. graminearum*. In order to minimize contamination of the phytopathogens, we examined the impact of antifungal compounds containing synthetic, natural antioxidants and fatty acids in the finished feed. Tested mixtures of substances covered are butylated hydroxyanisole, propyl paraben, thymol, decanoic and octanoic acid in different combinations and concentrations. None of the tested combinations of antifungal substance was effective in inhibiting the radial growth of *Fusarium graminearum*, nor in the synthesis of B trichothecenes. The tested mixtures are obviously a very stressful impact on *F. graminearum* resulting in stimulated synthesis of deoxynivalenol.

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Diplomski rad

UČINKOVITOST SMJESA ANTIFUNGALNIH TVARI NA RAST *FUSARIUM GRAMINEARUM* I SINTEZU B TRIHOTECENA U KRMNIM SMJESAMA

Danijela Dorotić

Sažetak:

Fusarium graminearum je mikotoksikogena plijesan koja se javlja kao kontaminant žitarica na polju i skladištima. Osim nastale ekonomske štete, bitne su i zdravstvene posljedice koje izazivaju B trihoteceni, mikotoksini koje sintetizira *F. graminearum*. U cilju smanjivanja kontaminacije ovim fitopatogenom ispitali smo utjecaj antifungalnih smjesa koje sadržavaju sintetske, prirodne antioskidanse i masne kiseline na gotovoj stočnoj hrani. Ispitane mješavine tvari obuhvatile su butilirani hidroksianisol, propil paraben, timol, oktansku i dekansku kiselinu u različitim kombinacijama i koncentracijama. Nijedna ispitana kombinacija antifungalnih tvari nije bila učinkovita u inhibiciji radijalnog rasta *Fusarium graminearum* kao niti u sintezi B trihotecena. Ispitane smjese očigledno vrlo stresno utječu na *F. graminearum* što rezultira stimuliranom sintezom deoksinivalenola.

Ključne riječi: *Fusarium graminearum*, B trihoteceni, stočna hrana, antioksidansi, masne kiseline

Summary:

Fusarium graminearum is mycotoxinogenic mould that occurs as a contaminant of cereals in the fields and warehouses. Apart from resulting economic damages are significant and the health effects caused by B trichothecenes, mycotoxins synthesized by *F. graminearum*. In order to minimize contamination of the phytopathogens, we examined the impact of antifungal compounds containing synthetic, natural antioxidants and fatty acids in the finished feed. Tested mixtures of substances covered are butylated hydroxyanisole, propyl paraben, thymol, decanoic and octanoic acid in different combinations and concentrations. None of the tested combinations of antifungal substance was effective in inhibiting the radial growth of *Fusarium graminearum*, nor in the synthesis of B trichothecenes. The tested mixtures are obviously a very stressful impact on *F. graminearum* resulting in stimulated synthesis of deoxynivalenol.

Key words: *Fusarium graminearum*, B trichothecenes, livestock feed, antioxidants, fatty acid