

## **Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri**

**Osman TİRYAKİ<sup>1</sup>**

**Emine SEÇER<sup>2</sup>**

**Cemile TEMUR<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> **Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 38039, KAYSERİ**

<sup>2</sup> **Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, ANKARA**

Geliş tarihi (Received): 01.11.2010

Düzeltilme (Revised): 19.03.2010

Kabul (Accepted): 30.03.2011

**ÖZ:** Mikotoksinler bazı fungus türleri tarafından üretilen, biyolojik orijinli, insan ve hayvanlarda akut veya kronik mikotoksikozizlere neden olan sekonder metabolitlerdir. Tarımsal ürünlerde mikotoksinler, hasat öncesi tarlada veya hasat sonrası uygun olmayan depo koşullarında toksin üreten fungusların gelişmesiyle ortaya çıkmaktadırlar. Bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler mikotoksin oluşumu üzerine etkilidir. Mikotoksinlerden kaynaklanan insan ve hayvanlardaki toksikozlarla ilgili raporlar, özellikle az gelişmiş ülkelerde olmak üzere, dünyanın her bir köşesinden gelmektedir. Mikotoksinlerin en zararlı toksik etkileri çoğunlukla karaciğer üzerinedir. Bilinen en tehlikeli mikotoksin grubu da aflatoksinlerdir. Toksin üreten funguslar ürüne hasat öncesinde, hasat sırasında veya hasat sonrasında olmak üzere 3 ayrı dönemde bulaşabilirler. Mikotoksinlere maruz kalma, fungusların oluşturduğu mikotoksinleri soluma ya da hasatta veya depolama sürecinde toksijenik fungusların bozduğu mikotoksinli gıdaların tüketilmesi ile olur. Son yıllarda Avrupa Gıda Güvenliği Kuruluşu ve Avrupa Komisyonu gıda maddelerinde mikotoksin seviyeleri konusunu sıcak tutmakta ve sürekli direktifler yayınlamaktadırlar. Ayrıca AB ülkeleri arasında dolaşan ürünlerde mikotoksinlerden kaynaklanan geri dönüşler ve bu ürünlerin hangi ülkelerden geldiği günlük rapor halinde hızlı alarm sistemlerinde (RASFF) duyurulmaktadır. Bu çalışmada ekonomik ve toksikolojik bakımdan önemli olan mikotoksinler ve bu mikotoksinlerin kalıntı analizlerine değinilecektir. Mikotoksin analizleri aynı pestisit kalıntı analizlerinde olduğu gibi kromatografik yöntemlerle (TLC, HPLC, LC-MS) yapılmaktadır. Bunun yanında serolojik yöntemlerde (ELISA, RIA) kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda LC/MS/MS sistemindeki hızlı gelişmeler çoklu mikotoksin kalıntı yöntemlerini olanaklı kılmaktadır. Mikotoksin analizleri için, AB kılavuzlarında ve Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde yer alan örnek alma metodları, laboratuvar örneği olarak alınması gereken miktarlar, örnek hazırlama ve analiz metodu kriterlerine de değinilecektir. Örneğin laboratuvara gelişinden başlayıp, ekstraksiyon, clean-up ve kromatografik değerlendirmeler, kalite kontrol kalite güvencesi ilkeleri doğrultusunda yapılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Mikotoksin, kalıntı, yem, aflatoksin, okratoxin, RASFF.

### **Mycotoxin Formation, their Toxicity and Mycotoxin Residue Analyses in Feeds**

**ABSTRACT:** Mycotoxins are biological seconder metabolite produced by some fungi. They cause acute or chronic mycotoxicosis in human and animal. In agricultural products, mycotoxins are produced by toxin producing fungi due to improper storage conditions during post-harvest and pre-harvest period. Some physical, chemical and biological factors affect mycotoxin production. There is a lot of toxicosis case report for human and animal in the world, particularly in less developed countries. The most harmful effect of mycotoxin is on liver and the most dangerous mycotoxin is aflatoxins. There are 3 routes of contamination of mycotoxin produced fungi, namely pre-harvest, at harvest and post-harvest. Two main routes of exposure have been identified, which are the inhalation of mycotoxins produced by fungi and the consumption of mycotoxins with food that has been spoiled by toxigenic fungi either before harvest or at storage. In recent years, some legislation and directives on mycotoxin level in food are published by European Food Safety and European Commission. Inappropriate products and their origin, due to mycotoxin are reported in daily basis in EU Countries by means of RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). This review deals with economical and toxicological important mycotoxins and their residue analysis. Mycotoxin analysis, similar to pesticide analysis, are carried out by chromatography (TLC, HPLC and LC-MS) techniques and also serological techniques (ELISA and RIA). Last developments of LC/MS/MS enable application of multi-mycotoxin residue analysis. With the update EU Directives and Turkish Codex principles, some analytical parameters such as sampling method, laboratory sample, sample preparation for mycotoxin analysis are discussed in this review. All assessments for the laboratory sample, extraction and chromatographic procedure were performed based on quality assurance and quality control.

**Key Words:** Mycotoxin, residue, feed, aflatoxin, ochratoxin, RASFF.

Sorumlu Yazar (Corresponding Author): Osman TİRYAKİ E-mail: osmantiryaki@yahoo.com

## GİRİŞ

Mikotoksinler, yem ve gıda maddelerinde fungus türleri tarafından sentezlenen metabolizma ürünleri olup, bunlarla beslenen hayvan ve insanlarda latent, akut, sub-akut veya kronik karakterde mikotoksikozislere neden olan toksik maddelerdir.

1960 yılında aflatoksin metabolitinin keşfinden sonra mikotoksinler yoğun araştırılan bir konu olmuştur. Günümüzde 350 fungus türünün 400'den fazla mikotoksin ürettiği bilinmektedir. Mikotoksin üreten küf funguslarının çoğunluğu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus* ve *Cladosporium* cinsleri içinde yer almaktadır (Kielstein, 1993; Tunail, 2000).

Hayvanlardan yüksek miktar ve nitelikte ürün alımında kullanılan yemin mikrobiyolojik ve mikotoksikolojik yapısı büyük önem taşımaktadır. Yemin hijyenik kalitesinin önemi sadece hayvanlar için değil, hayvanlardan elde edilen ürünleri tüketen insanlar için de geçerlidir. Son yıllarda sağlıklı ve kaliteli ürünlerin tüketilmesine yönelik tüketicinin bilinçlenmesi gıda güvenliğini önemli hale getirmiştir. Ayrıca bu konunun uluslararası ticari boyutu da vardır (Basmacıoğlu ve Ergül, 2003). Nitekim AB ülkeleri arasında dolaşan ürünlerde mikotoksinlerden kaynaklanan geri dönüşler ve bu ürünlerin hangi ülkelere geldiği günlük rapor halinde hızlı alarm sistemlerinde (RASFF) duyurulmaktadır.

Mikotoksinlerden deoxynivalenol (DON), T2-toxin ve HT-2 toksininin insan ve hayvan sağlığı üzerine, gıda ve yemlerde hatta en son işlenmiş ürünlerdeki kontaminasyon seviyelerine bağlı olarak, çok çeşitli zararlı etkileri vardır (Fels-Klerx ve ark., 2008). Gıda güvenliği üzerine artan kamuoyu ilgisi ve uluslararası ticaretteki önemi dolayısıyla AB'nde gıdalardaki birçok mikotoksinler (Anonymous, 2006) ve yemlerdeki aflatoksin (Anonymous, 2003) resmi tebliğler ile (maksimum mikotoksin limitleri) çok yakından izlenmektedir. Mikotoksin oluşumunu en aza indirmek için, gıda

işleme endüstrisi ve gıda güvenliği otoriteleri tarafından, HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) gibi koruma ve kontrol sistemleri, erken uyarı ve tahmin modelleri ve modern tanı ve analiz yöntemleri geliştirilmiş ve yürürlüğe konmuştur.

Son yıllarda Avrupa Gıda Güvenliği Kuruluşu (European Food Safety Authority, EFSA) ve Avrupa Komisyonu gıda maddelerinde mikotoksin seviyelerini azaltmak için *Fusarium* toksinleri, limitleri, düzenlemeler üzerine görüşlerini sıkça açıklamaktadır. Bu anlamda European legislation (Reg, 1881/2006)'da DON mikotoksini için buğdayda 500 mg/kg, unda ise 750 mg/kg kalıntı limiti konmuştur (Anonymous, 2006).

Bu inceleme makalesinde, yemlerde önemli olan mikotoksinler ve bu mikotoksinlerin kalıntı analiz yöntemlerinden (kromatografik ve spektrofotometrik) bahsedilecektir. Ayrıca çalışmada, mikotoksinlerle ilgili AB kılavuzlarında ve Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde yer alan örnek alma metotları, metot validasyonu, geri alım limitleri gibi kalite kriterlerine ve Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL)'ne değinilecektir.

## MİKOTOKSİN OLUŞUMU VE ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Tarımsal ürünlerde mikotoksin oluşumu, uygun koşullarda ürüne bağlı olmak üzere, hasattan tüketime kadar hemen her aşamada meydana gelebilmektedir. Funguslar büyüme ve gelişmelerini tamamladıklarında, hücrelerinde birikmiş bulunan fazla karbonhidratı ikincil metabolizma yoluyla mikotoksinlere çevirirler (Oruç, 2005).

Tarımsal ürünlerde gelişen funguslar toksin oluşumunun temel sebebi olmakla birlikte, fungusların mikotoksin oluşturmada çevresel faktörler çok önemlidir (Seçer, 2000). Bu faktörler kısmen fungusun gelişmesi için de gereklidir (Tunail, 2000). Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler Çizelge 1'de etraflıca maddeler halinde özetlenmiştir.

## YEMLERDE BULUNAN MİKOTOKSİNLER VE OLUŞTURDUĞU TOKSİKOZİS OLAYLARI

Günümüze kadar 350 fungus türünün mikotoksin oluşturduğu ve bunlar içinde 20-25 mikotoksin çeşitinin yem ve besinlerde doğal kirletici olarak buldukları ve bu besinlerin tüketilmesi durumunda, hayvanlarda ve insanlarda sıklıkla zehirlenmelere sebep olduğu belirtilmiştir (Anonim, 2010a).

Mikotoksinlerin vücutta etkili oldukları organ ve dokulara göre veya etki mekanizmalarına bağlı olarak çeşitli etkilerinden söz edilir. Karaciğere etki edenler "hepatotoksik", deriye etkili olanlar "dermatotoksik", böbreklerde toksik etki yapanlar "nefrotoksik", sinir sistemine etki edenler "nörotoksik", bağışıklık sistemini etkileyenler "immunosupresif" veya "immunosupresif" olarak tanımlanırlar. Toksik etkilerinden başka; mutajenik, kanserojenik, teratojenik, halusinojenik, östrojenik, tremorjen etkileri de görülebilmektedir (Tunail, 2000). Ancak, en fazla etkilenen organ karaciğerdir. Bu nedenle de mikotoksinlerin çoğu hepatotoksik bir karektere sahiptirler. Çizelge 2'de yemlerde bulunan mikotoksinler ve oluşturduğu toksikozis olayları özetlenmiştir.

Çeşitli literatürlerde yüksek organizmalara en etkili olan mikotoksinler sırasıyla aflatoksinler, *Fusarium* türlerinin oluşturduğu trikotesenler, fumonisinler ve okratoksin-A olarak

belirtilmektedir (Tunail, 2000; Karabulut ve Değirmencioğlu, 2002).

## FUNGUSLARIN ÜRETTİĞİ ÖNEMLİ MİKOTOKSİNLER

### A. Aflatoksinler

Aflatoksinler, başlıca *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, vb) ve *Penicillium* (*P. puberulum*, *P. variable*, *P. citrinum* vb.) türleri tarafından üretilen sekonder metabolit grubudur (Erzurum, 1996). Şimdiye kadar 8 ayrı türevi (B1, B2, B2a, G1, G2, G2a, M1, M2) saptanmış olup, bunlardan en fazla toksik etkili olanı B1'dir. Bu toksinler ışığa karşı duyarlıdır. Özellikle depolama esnasında bir çok besin ve hayvan yemi ürünlerinin uygunsuz nem ve sıcaklıklarda bekletilmesi sonucunda aflatoksinler oluşur. Pişirme sıcaklığında bozulmazlar ancak 270°C'de bozuldukları belirtilmektedir (Ayaz ve Yurttagül, 2008).

Aflatoksikozis, insan ve hayvanlarda, genellikle, aflatoksin B1 tarafından oluşturulan, akut, subakut veya kronik seyirli bir mikotoksikozisdir. Bu toksinin ultraviyole ışınları altında gösterdiği floresan özelliğine göre, mavi floresan veren aflatoksin-B1 ve aflatoksin-B2 ile yeşil floresan veren aflatoksin-G1 ve aflatoksin-G2 gibi dört temel komponentinin yanısıra hayvanların sütleri ile çıkan süt toksinleri aflatoksin-M1 ve aflatoksin-M2 bulunmaktadır (Anonymous, 2010b).

Çizelge 1. Mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler (Kielstein, 1993).  
Table 1. Factors affecting mycotoxin production (Kielstein, 1993).

Fiziksel faktörler Physical factors	Kimyasal faktörler Chemical factors	Biyolojik faktörler Biological factors
Nemlilik	CO <sub>2</sub>	Fungal enfeksiyon, inokulum miktarı
Substrat nemliliği	O <sub>2</sub>	Bitki çeşidi, bitki dayanıklılığı
Kuruma hızı	Substratın yapısı	Bitki stresi, bitkinin hastalıkları
Yeniden nemlenme	Substrata yapılan kimyasal uygulamalar	Fungusların genetik farklılığı
Nispi hava nemi	Kimyasal işlemler (gübreleme, ilaçlama)	Mikroorganizmalar arasındaki ilişki
Sıcaklık		Zararlıların faaliyeti
Mekanik zararlanma		Fungal izolat farklılıkları
Zaman		
Hububatın karıştırılması		

Çizelge 2. Yemlerde bulunan mikotoksinler ve potansiyel toksisiteleleri (Basmacıoğlu ve Ergül, 2003; Suttajit, 2000).  
Table 2. Mycotoxin in feed and their potential toxicity (Basmacıoğlu ve Ergül, 2003; Suttajit, 2000).

Fungus Fungus	Mikotoksin Mycotoxin	Etkili olduğu yem Feed effected	Etki Effect	Etkili Olduğu Tür Species Effected
<i>Aspergillus ve Penicillium</i>	Aflatoksin (B1,B2,G1,G2)	Mısır ve diğer tahıllar, pamuk tohumu küspesi, sorgum, yerfıstığı	Karaciğer tahribatı, bağışıklık sisteminde tahribat, kanserojen, kanama	Tüm türler
<i>Aspergillus ve Penicillium</i>	Okratoksin	Mısır ve diğer tahıllar, pirinç	Böbrek tahribatı	Domuz, kanatlı
<i>Aspergillus ve Penicillium</i>	Siklopiazonik asit	Yerfıstığı, mısır ve diğer tahıllar	Böbrek tahribatı, kabuk kalitesinde azalma	Domuz, kanatlı
<i>Fusarium</i>	Deoksinivalenol (DON, vomitoksin)	Mısır ve diğer tahıllar	Sindirim ve dolaşım sistemi bozuklukları, iştahta azalma, kusma, sinirsel tahribat	Domuz, sığır, kanatlı
<i>Fusarium</i>	T-2	Mısır ve diğer tahıllar	Azalan yumurta verimi, kabuk kalitesinde kötüleşme	Kanatlı
<i>Fusarium</i>	Zearalenon	Mısır ve diğer tahıllar, çayırotu, saman	Üreme sisteminde tahribat	Domuz, koyun
<i>Fusarium</i>	Fumonisin	Mısır, tahıl	Sinir sisteminde tahribat	At, domuz, kanatlı
<i>Penicillium</i>	Sitrinin	Mısır, arpa ve karma yemler	Böbrek ve karaciğer tahribatı, ödem	Kanatlı, koyun, at
<i>Penicillium</i>	Rubratoksin	Mısır	Hepatik sendrom, kanama	Sığır, domuz
<i>Penicillium</i>	Patulin	Buğday	Deri lezyonları, sinirsel sendromlar	Sığır
<i>Claviceps</i>	Ergot	Sorgum	Büyümede gerileme	Tüm türler
<i>Alternaria</i>	Tenuazoik asit	Tahıllar	----	Tüm türler

Aflatoksinler genellikle akut, subakut veya kronik aflatoksikozise neden olurlar. Tavuk ve civcivlerde gelişme bozuklukları, yumurta veriminde düşme ve durgunluk gözlenir. Bu hayvanlarda aflatoksikozis kronik bir seyir izler. Hindi ve ördek yavrularında yeme karşı isteksizlik, genel bir zafiyet, tüylerin kabarması, uyuşukluk, opistotonus vardır. Ördek yavruları diğer kanatlılardan çok daha fazla duyarlıdır. Hastalık akut bir seyir izler ve öldürücüdür. Nekropside, iç organ ve dokularda hemorajiler, safra kanallarında hiperplazi, karaciğer parenkiminde nekrozlar, siroz, yağ infiltrasyonları görülür (Anonymous, 2010b).

## B. Okratoksinler

Okratoksinler, *Aspergillus ochraceus*, *A. melleus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. albertensis*, *A. wentii*, *A. auricomus*, *A. niger* var. *niger*, *A. sulphureus* ve *Penicillium viridicatum* *P. cyclopium*, *P. frequentans*, *P. nidulans* ve *P. expansum* fungusları tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Bu toksinin A, B ve C

olmak üzere üç türe vardır. Özellikle okratoksin A (OTA) kuvvetli bir toksik etkiye sahiptir. OTA; mısır, kuru fasulye, kuru üzüm kakao çekirdeği, kahve çekirdeği, soya fasulyesi, arpa, yulaf, turuncgil meyveler ve yer fıstığı gibi besinlerde bu küflerin gelişmesi sonucu oluşmaktadır. Toksin, hayvanların büyümesini engellemekte, böbrek genişlemeleri ve diğer bozukluklara yol açarak ölümlere neden olmaktadır. Okratoksinin insanlardaki böbrek hastalıkları ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (Ayaz ve Yurttagül, 2008; Girgin, 2001).

Okratoksin A (OTA) yem maddelerinde rastlanan mikotoksinlerden biridir. Kompetitif fenil alanin-tRNA-sentetaz inhibisyonu yapmak suretiyle protein sentezini durdurur. Kanatlılarda OTA zehirlenmelerinde yem tüketiminde, ağırlık artışında ve yumurta veriminde azalma görülür. Okratoksin yumurta ve dokulara da geçer. Ruminantlarda ön midelerdeki mikrobiyel aktivite nedeniyle OTA toksisitesi tek midelilerden daha düşüktür (Yıldız, 2009).

### C. Fumonisinler

Fumonisinler *Fusarium* türleri tarafından üretilmelerine rağmen en önemli kaynakları *Fusarium moniliforme* ve *F. proliferatum* türleridir. Fumonisinler, çeşitli türlerdeki farklı hastalıklardan sorumlu nongenotoksik karsinojenlerdir. Üretimleri için optimum koşullar nem, yaklaşık 20°C sıcaklık ve 11-13 haftalık bir süredir. Fumonisin grubunun başlıca toksinleri FB1 ve FB2'dir. Fumonisinlerden FB1 ve FB2 hayvanlar üzerinde türe bağlı olarak nörotoksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite, immünosupresyon, gelişim bozuklukları ve karaciğer tümörleri oluşturmaktadırlar. Sığır ve kümes hayvanlarında 50 µg/g'a kadar fumonisine izin verilmektedir (Girgin, 2001).

Fumonisinlere özellikle mısırdaki sıklıkla rastlanılmaktadır. Fumonisinlerin hepsi kanserojen etkili olup, fumonisin türevleri (FB1, FB2, FB3, FB4, FC1, FA1 ve FA2) arasında FB1, en önemli mikotoksindir. Fumonisin B1'in, atlarda beyin ödeme (Leukoencephalomacia), domuzlarda akciğer ödeme ve farelerde karaciğer kanserine neden olduğu bildirilmiştir (Ayaz ve Yurttagül 2008).

### D. Trikotesenler

Trikotesenleri *Fusarium*, *Trichoderma*, *Myrothecium* ve *Stachybotris* türleri oluşturur. Günümüze kadar küf kültürlerinden 140'tan fazla trikotesen tipi izole edilmiştir ve bu sayı artmaya devam etmektedir. Trikotesenler "12,13-epoksitrikotes-9-en halkası" temel alınarak kimyasal yapılarına göre A, B, C ve D olmak üzere dört farklı gruba ayrılırlar. B tipi trikotesenlerin A tipinden farkı α- ve β- bağına sahip olmasıdır. Bu iki alt tip izole edilmiş 140 civarındaki toksinin yaklaşık 100'ünü oluşturur. C tipi ilave bir epoksit grubu ile karakterizedir, D tipi ise makrosiklik trikotesenlerden oluşmaktadır. (Girgin, 2001). Yapılan bir çalışmada trikotesen grubu mikotoksinlerden olan ve mısırlarda patojen olan *F. moniliforme* ve *F. graminearum* oluşturduğu Fumonisin ve Deoxynivalenol mikotoksinlerinin AB limitlerinin üzerinde çıktığı tespit edilmiştir (Uçkun, 2008).

T-2 ve HT-2 toksinler, diasetoksiskirperol (DAS), deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV) bu grupta yer alan en önemli mikotoksinlerdir. Toksisite sıralamaları T-2 toksin > DAS > DON > NIV şeklindedir. DON, gıda ürünlerinde en sık rastlanan mikotoksindir (Sabuncuoğlu, 2008).

Trikotesenlerin en bilinen toksikozları lökositlerdeki belirgin azalış ile karakterize olan "Alimentary Toxic Aleukia" (ATA) hastalığıdır. T-2 toksin, en yüksek toksisiteye sahip (kardiyovasküler, sindirim ve immünolojik sistemlerin fonksiyonlarında bozulmaya neden olur) trikotesendir. Zehirlenmeler, daha çok küflenmiş tahıl yemleri ile beslenen hayvanlarda ve açlık dönemlerinde bu tahılları yiyen insanlarda görülmüştür (Ayaz ve Yurttagül, 2008; Sabuncuoğlu, 2008). Trikotesen içeren gıdaları alan hayvanların karaciğer, kalp, kas ve böbreklerinde bu toksine rastlanabilir. Gebe hayvanlara toksinli gıda verildiğinde sütleri ile dışarı çıkarlar. Toksin, hayvanlarda kilo alamama, dizanteri, çeşitli doku ve organlarda kanamalar, ağızda ve karaciğerde nekrotik odaklar, mukoza ve deride lezyonlar meydana getirir (Aydın, 2010). Yumurta üretiminde ve yumurta kalitesinde düşmelere ayrıca, civcivlerde anormal tüy oluşumuna da neden olur. Anormal tüyün meydana gelmesine T-2 toksininin ana besin maddeleri (protein, yağ, karbonhidrat) metabolizmasında meydana getirdiği değişikliklerin sebep olduğu ileri sürülmektedir (Anonymous, 2010b).

DON, epoksi-seskiterpenoid yapısında, tip-B trikotesen olan mikotoksindir. Akut maruziyeti anoreksi (iştahsızlık) ve emezise (bulantı) neden olur (Sabuncuoğlu, 2008).

Bu toksinler, renksiz, kristal, suda erir, optikli aktif moleküllerdir. Saklama süresince ve normal pişirme ile bozulmazlar. Normal analizle tahıllarda bunları tanımak güçtür. Bunlar, dolaylı yollardan etkilenmiş besinlerden laboratuvar kültürleri yapılarak izole edilmişlerdir. Bu toksinleri üreten küfler bir çok besinde çoğalabilmektedirler. Bunlar arasında, mısır ürünleri, pirinç ve diğer taneler ve türevleri yer almaktadır. Bu toksinler protein ve

DNA sentezini inhibe ederler. Ayrıca bazıları antibakteriyel, antiviral ve antifungal aktiviteye sahiptirler (Ayaz ve Yurttagül, 2008).

### E. Patulin

Patulin *Aspergillus clavatus*, *Penicillium expansum*, *P. patulum*, *P. aspergillus* ve *P. byssochlamys* dahil olmak üzere *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinin çoğu türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. 4-hidroksi-4H-furol [3,2-c] piran-2(6H)-on yapısındadır. Pek çok organik solventte ve suda çözünebilir (Girgin, 2001).

Patulin, pek çok canlı için toksik bir maddedir. Sülfhidril gruplarına olan afinitesi nedeniyle bazı enzimleri inhibe etmektedir. Patulinin, sıçanlarda lenfosit sayısında ve kapiller permeabilitede artma gibi değişikliklere neden olabildiği tespit edilmiştir. Kromozom kırıklıkları ile karakterize çekirdek gelişim bozukluklarından sorumlu tutulmuş ve dolayısıyla kanserojen bir madde olduğu bildirilmiştir (Sabuncuoğlu, 2008).

Patulin en çok; elma suları, küflü ekmek ve diğer meyve sularında (üzüm, şeftali vb) bu küflerin çoğalması sonucu oluşmaktadır. Patulinin, antibiyotik özelliklerinin yanında kanserojen, mutajen ve teratojen niteliklerinin olduğu da saptanmıştır. Patulinin dokularda ödem, hemoraji, bulantı ve kusma gibi belirtilere neden olması yanında muhtemel karsinojen olduğu bildirilmektedir. SO<sub>2</sub> ve C vitamini patulini parçalar. Ayrıca üzüm şirasının fermentasyonu sonucunda da patulin parçalanmaktadır. Patulin asidik ortamlarda (pH 6'ya kadar) stabildir. Bu pH değerinde ısıya karşı dirençli olup 125°C'ye kadar bozulmamaktadır. Bu nedenle patulin özellikle meyve suyu gibi gıdalarda önem taşımaktadır (Ayaz ve Yurttagül, 2008).

### F. Zeralenonlar

Zeralenon (ZON); mısır, arpa, yulaf, buğday ve darılarda yaygın olarak bulunabilen *Fusarium* türleri tarafından farklı şartlarda üretilen bir mikotoksindir. Örn. *F. roseum* tarafından ZON

üretimi için yüksek (24-27°C) ve düşük (12-14°C) olmak üzere iki farklı sıcaklık alternatifi bulunmaktadır. Düşük sıcaklık enzim aktivasyonu için şarttır, fakat enzim bir kere aktive olduğunda yüksek sıcaklıklarda da toksin üretebilmektedir (Girgin, 2001).

Zeralenon (ZON) *Fusarium* türü funguslarca üzüm, mısır ve yüksek nem içeriği olan saman yığınlarında sıklıkla üreyen östrojenik yapıli mikotoksindir (Sabuncuoğlu, 2008). Bu nedenle FES (Fermentasyon östrojenik Madde) veya F-2 toksini adları ile de bilinir. Zeralenonla kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanların büyümeleri yavaşlar. Domuzlarda abortus ve infertiliteye de rastlanabilir. Bu tarz değişimler domuzların dışındaki diğer hayvanlarda da görülebilir. Fakat bunlarda daha az belirgindir. Toksinin 1 ppm miktarındaki dozu sığırlarda süt salgısında azalma, iştahsızlık ve vulvada şişkinliklere neden olur. Mikroskopik olarak myometrium ve endometriumda kalınlaşma, meme dokusunda proliferasyon (hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalarak artması), serviks (rahim ağzı kanseri) ve vajinada skuamatöz metaplazi görülür. Toksin idrarla ve dışkı ile atılır. Kanatlılar toksine dirençlidir (Anonymous, 2010b).

Zeralenon (ZON) dünyanın her iklim bölgesinde bulunabilen bir fungus metabolitidir. Bu metabolit direk bir toksin olmaktan çok hormon benzeri kimyasal yapı gösterir. Tahıllar, mısır ve domates için çok önemli sorun olup, bitkilerde pek çok hastalık yapabilmektedir. Bulaşma tarladan itibaren olup, yüksek ısı ve rutubet gibi uygun olmayan depolama şartları insan ve hayvanlara geniş tahribatlar yapar. ZON'un 1-5 ppm'lik düzeyleri canlılarda fizyolojik hasarlar meydana getirebilmektedir. Bu düzeyde ZON ihtiva eden mısır hormon düzenini bozarak, üreme sistemleri üzerinde tahribat yapmaktadır. ZON, mutajenik ve kanserojen etkili olup, bazı hayvanlarda, özellikle cinsel organlarda toksik etkiler göstermektedir.

Zeralenon, funguslar tarafından üretildiği bilinen tek bitkisel östrojen olup, bu özelliği ile ticari bir

öneme sahiptir. Zeralenon türevlerinden biri olan Zeralenol (Zeranol) anabolik ajan olarak kullanılmaktadır (Ayaz ve Yurtagül, 2008).

## MİKOTOKSİNLERLE KONTAMİNASYON YOLLARI

Mikotoksin kontaminasyon düzeyi iklim koşullarına, ürünün cinsine ve coğrafi konuma bağlı olarak mevsimden mevsime, yıldan yıla farklılık gösterebilir (Girgin, 2001). Ancak toksin üreten funguslar ürüne hasat öncesinde, hasat sırasında veya hasat sonrasında olmak üzere 3 ayrı dönemde bulaşır. Bunlardan birincisi inokulasyonu tarlada (hasat öncesi) gerçekleştiren *Fusarium* genusuna bağlı bitki patojeni funguslardır. İkincisi, depo döneminde inokulasyonu gerçekleştiren *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarına bağlı funguslar, üçüncüsü ise sadece fiziksel zarara uğramış yaralı ürünlerde hasat sonrasında bozulmalara neden olan *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Scopulariopsis*, *Rhizopus*, *Mucor* ve *Absida* genuslarına bağlı funguslardır (Karabulut ve Değirmencioğlu, 2002).

Berthiller ve ark, (2007) mikotoksinlere maruz kalma şekli, ya küflerin oluşturduğu mikotoksinleri soluma (çoğunlukla fungus sporları) ile ya da hasatta veya depolama sürecinde toksijenik küflerin bozduğu mikotoksinli gıdaların tüketilmesi ile olduğunu bildirmektedirler.

Toksin oluşturan tarla fungusları, hasattan önce olgun danelere bulaşan, pas ve yanıklık etmenlerinin dışında kalan funguslardır. Bunlar arasında önemli olanlar; *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Stemphylium* ve *Verticillium* cinsleridir. Fungusların oluşturduğu sporlar rüzgar ve su ile danelere taşınır veya bitkinin enfekte olmuş kısımları danelerle temas eder. Kontamine danelerde, sporların çimlenmesi ve fungusların üremesi sonucunda renk ve görüntü değişir, çimlenme kabiliyeti düşer, mikotoksinler oluşur. Depo fungusları siloların yetersiz temizliği nedeniyle silolarda sürekli bulunur ve gelen ürünü kontamine eder. Ancak depo funguslarının danelere bulaşması asıl hasat zamanında olur.

Gıdalara mikotoksin bulaşması çeşitli yollarla gerçekleşir; 1. *Direk kontaminasyon*: Gıdanın gözle fark edilir şekilde küflenmesi mikotoksinin direkt kontaminasyonuna neden olur. Direkt kontaminasyon ekmekte, meyvelerde, doğal küflerle olgunlaştırılan et ürünlerinde, süt mamullerinden özellikle peynirlerde görülür. 2. *Dolaylı kontaminasyon*: Gıdaların mikotoksinlerle indirekt kontaminasyonu, mikotoksinle kontamine olmuş hammaddelerin veya katkı maddelerinin gıda üretiminde kullanılmasıyla meydana gelir. Patulinle bulaşık meyvelerin, meyve suyu veya konsantreleri şeklinde işlenmesi sonucu patulinin varlığına bu ürünlerde rastlanır. 3. *Taşınma-kalıntı (carry over)*: Çiftlik hayvanları mikotoksinlerle kontamine yemlerle beslendiklerinde toksinleri metabolize ederek, büyük kısmını atarlar. Ancak metabolize formlara kanda, sütte, bazı organlarda hatta yağlı dokularda rastlanır. Aflatoksin içeren yemlerin süt ineklerine yedirilmesi sonucu aflatoksin B1 ve aflatoksin B2, aflatoksin M1 ve aflatoksin M2'ye dönüşerek kalıntı halinde sütte ortaya çıkar (Tunail, 2000).

## MİKOTOKSİN KALINTI ANALİZLERİ

Mikotoksin analizleri için çoğu analitik prosedürler şu analitik basamakları içerir: Örnekleme, homojenizasyon, ekstraksiyon, clean-up ve örneğin konsantrasyonu. Nihai ayrıştırma ve dedeksiyon kromatografik teknikler veya immunokimyasal metotlarla yapılır. Immunokimyasal metotlar her bir mikotoksine özgü antibadi gerektirirken, kromatografik teknikler çok sayıda analiti ayrıştırabilir. HPLC-MS/MS mikotoksin ve metabolitlerinin belirlenmesinde çok kullanışlı bir araçtır. GC metotları polar bileşiklerin analizinden önce genellikle türevlendirmeye ihtiyaç duyar. Bu da zaman israfı ve potansiyel hataya sebep olabilir. Bununla beraber trikotesen ve zeralenon (ZON) mikotoksinlerinin kantitatif analizinde GC-MS başarı ile kullanılmıştır (Tanaka ve ark., 2000). Sonuç olarak kütle spektrofotometresi, UV absorbans veya floresans gibi kimyasal özelliklere bağlı olmayan bir dedektördür. Matris etkisi LC-MS'in başarısını kısıtlar. İyon baskılama (veya

artışı) ilgilenen analit ile beraber gelen matris bileşiklerinin oluşturduğu bir etkidir. Bunun önüne geçmenin yolu matrisli standartlar kullanmak veya toksin/matris kobinasyonu ile çalışmaktır. Çoklu-mikotoksin metotları sadece ekstraksiyon ve clean-up basamakları optimum olduğu sürece ümitvardır. Böyle metotlar konvansiyonel metotlarla karşılaştırıldığında analitik işgücünde büyük bir azalış sağlarlar ve analitik verimde büyük bir artışa neden olurlar (Berthiller ve ark., 2007). En son generasyon elektro spray kullanılan LC-MS/MS cihazları, ön clean-up işlemine gerek kalmaksızın ham bitki ekstraktının analizine olanak verir (Spanjer ve ark., 2006).

Mikotoksinlerin analizinde, ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi (ELISA) (Oruç, 2005) ve radio-immunassay (RIA) yöntemi kullanılmaktadır. Bunlardan en fazla ve rutin olarak TLC ve HPLC kullanılır. Mikotoksinlerin uçucu olmamasından dolayı, GLC'nin kullanımı sınırlıdır. Ancak floresan olmayan trichotecen'lerin belirlenmesinde GLC uygundur. Kalitatif olarak - yani örneğimizde var ya da yok şeklinde belirlemek-UV lambası altında görsel olarak belirlenebilmektedir (Smith ve Moss, 1985).

TLC mikotoksinlerin analizinde en çok kullanılan bir tekniktir. TLC kalitatif veya yarı kantitatif bir analiz yöntemi olup, genellikle clean-up'a gerek duyulmaz. TLC'de cam bir levha üzerine ince bir tabaka halinde ve homojen olarak yayılan sabit (katı) faz (silikajel, alüminyum oksit vb) ve hareketli faz (aseton, metanol, hekzan) kullanılır. HPLC hassas, güvenilir ancak pahalı ve clean-up'a ihtiyaç duyan bir analiz yöntemidir. HPLC ile analizde hangi mikotoksinin hangi dedektörle aranacağına bilinmesi gerekir. Aflatoksinler, fumonisinler ve okratoksin A(OTA) analizlerinde floresans dedektör; trikotesenlerin analizinde UV veya DAD dedektörü kullanılır. Ayrıca mikotoksinler kütle dedektörü ile de LC-MS veya

LC-MS/MS sisteminde analizleri yapılır. Bu analizler daha hassas ve güvenilirdir. Aflatoksin, fumonisin, okratoksin analizinde temelde C-18 kolonları ve mikotoksinlerin ekstraksiyon aşamasında toksinlerin daha konsantre ve saf olarak elde edilebilmesi için genellikle İmmüno Affinite Kolonları (IAK) kullanılmalıdır (Oruç, 2005).

ELISA ucuz, ön hazırlığı kolay, hızlı sonuç veren ancak doğrulama gerektiren bir yöntemdir. ELISA'da ise katı yüzeylere bağlanmış az miktarda antikor ile örneklerde bulunan toksin ve toksin ile işaretlenmiş enzimlerin bağlanmasını temel almaktadır. Yıkama sonrası bağlanmamış enzimler ayrılmakta, kullanılan belirli substrat ile meydana gelen renkli madde miktarı, toksin miktarı ile ters orantılı olarak hesaplanabilmektedir (Oruç, 2005). RIA'da ise ekstraksiyon ve clean-up işleminden sonra yüksek spesifik aktiviteli radyoaktif markerlar kullanılır.

Ekstraksiyon, clean-up işlemi ve dedeksiyonları farklı olan, birçok mikotoksinin aynı anda belirlenmesini sağlayan multi-mikotoksin analiz metotları geliştirilmiştir. Tek bir ekstraksiyon ile mikotoksinlerin pozitif varlığı anlaşılır, sonra da mikotoksinin kantitatif analizi, o mikotoksin için spesifik metotla yapılır. Çoğu multi-mikotoksin analizinin temelini TLC oluşturmaktadır. Bunlar, tahıl ve ürünleri, yağlı tohumlar, hayvan yemleri ve süt konsantrelerinin analizlerinde kullanılır (Smith ve Moss, 1985).

Soares ve Rodriguez-Amaya (1989), tahıllarda TLC ile multimikotoksin analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem, MeOH ve % 4'lük KCl ile ekstraksiyon, kloroform ile organik faz ayrımı, susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bulunan filtre kağıdından süzülerek yapılan clean-up ve TLC ile dedeksiyonunu içerir (Seçer, 2000).

Seçer (2000), "Açık alanlarda depolanan buğdaylarda gelişen funguslar ve bunların oluşturduğu toksinler üzerinde araştırmalar" konulu tez çalışmasında, Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü'ne bağlı 4 farklı bölgede, açık



yıgın şeklinde depolanan buğdaylardan, 1993 yılı ürününden 41, 1994 yılı ürününden 34 ve 1996 yılı ürününden 14 olmak üzere alınan toplam 89 buğday örneği su aktivitesi, fungal flora ve mikotoksin içeriği yönünden incelemiştir. Mikotoksin analizlerinde, örneklerde aflatoksin B1, Okratoksin A, Sterigmatosistin ve Zeralenon mikotoksinleri yönünden ince tabaka kromatografi yöntemiyle multi-mikotoksin analizi yapılmıştır. Toplam 89 örnekte Okratoksin A, Sterigmatosistin ve Zeralenon tespit edilmemiştir. Aflatoksin B1 ise sadece 1994 yılına ait bir örnekte 1.12 µg / kg düzeyinde saptanmıştır. Kullanılan metodun geri alma oranı, Aflatoksin B1 için % 68,25, OTA için % 84,12, Sterigmatosistin için % 93,3 ve ZON için % 82,94 bulunmuştur.

Siegel ve ark. (2010), *Alternaria* mikotoksinlerinin ekmek yapım sürecinde degradasyonu üzerine çalışmışlar ve HPLC-MS/MS ile örnek matrisli kalibrasyon kullanarak (Tiryaki, 2009) yaptıkları analizlerde mikotoksinlerin stabil kalmalarını şu sıralamada bulmuşlardır: alternariol monomethyl ether >alternariol > altenuene.

Berthiller ve ark. (2007), tahıllarda 90 adet mikotoksin ve onların konjuge metabolitlerinin LC-MS/MS ile çoklu-mikotoksin metodu ile analizi üzerine çalışmışlardır.

Nielsen ve Smedsgaard (2003), LC-UV-MS metodu ile 474 adet mikotoksin ve metaboliti analiz metodu geliştirmişler ve veri tabanı oluşturmuşlardır. Positif electrospray ionization (ESI) modu- TOF kütle spektrofotometresi - DAD dedeksiyon sistemini mikotoksin analizlerinde kullanmışlardır.

Sulyok ve ark. (2006), tahıllarda, A- ve B-trichothecene'leri, ZON ve ilgili türevleri, fumonisin, enniatin, ergot alkaloidleri, okratoksinler, aflatoxinleri ve moniliforminleri içeren 39 adet mikotoksinin LC-ESI-MS/MS metodu ile analizi üzerine çalışmışlardır. Birbirini takip eden iki kromatografik enjeksiyonda en iyi hassasiyeti elde etmek için electrospray ionization (ESI) modu seçilmiştir. Metotta clean-up basamağı olmadığı ve

iyi bir geri alım elde etmek için ham ekstraktlar (örn., mısır ekstraktı) seyreltilmelidir.

Son yıllardaki LC-TOF/MS sistemindeki gelişmeler, kompleks biyolojik materyallerden az miktarda örnek olarak geniş bir sekonder metabolitlerin hızlı bir şekilde analizine çoklu mikotoksin metodu imkan vermektedir. Şenyuva ve ark. (2008) bu anlamda incirlerde mikotoksin taraması amacıyla yaptıkları çalışmada LC-TOF/MS sistemi ile aflatoxin B1 ve diğer sekonder metabolitleri aynı anda tarayabilmişlerdir.

LC-MS mikotoksin analizleri ile ilgili çok geniş bir çalışma Sforza ve ark. (2006) tarafından yapılmış ve yayınlanmıştır.

## MİKOTOKSİN KALINTI ANALİZLERİNDE KALİTE KONTROL/KALİTE GÜVENCESİ (QA/QC) KRİTERLERİ

### A. Örnekleme

Mikotoksinlerin belirlenmesinde kullanılan bütün kimyasal analitik işlemler; Örnek alma, örnek hazırlama, ekstraksiyon, temizleme, konsantrasyon, kalitatif ve kantitatif analiz ve doğrulama aşamalarından oluşmaktadır (Smith ve Moss, 1985). Mikotoksin analizlerinde örnek alma ve analiz örneğinin hazırlanması en önemli aşamalardır. Bir yığın içinde mikotoksin dağılımı homojen olmadığından bir yığından alınacak örnek miktarının ve analiz için tüm yığını temsil edecek analiz örneği miktarının belirlenmesi çok önemlidir. Alınan örneğin öğütülerek mikotoksinle bulaşık parçacıkların etkili bir şekilde dağılımını sağlamak için homojen hale getirilmesi gerekmektedir (Campell ve ark., 1986).

Bu anlamda 26.04.2007-tarih ve 26504 sayılı Resmi Gazetede (Anonymous, 2007) mikotoksinlerle ilgili örnek alma, örnek hazırlama ve analiz metodu tebliği yayınlanmıştır. Analiz edilecek her partiden (orijin, çeşit, ambalajlayıcı, ambalaj tipi, işaretleme, sevkiyatı yapan gibi özelliklerinin aynı olduğu belirlenen ve bir seferde teslim edilen tanımlanabilir miktardaki gıda maddesi) örnek alınmalıdır. Laboratuvara getirilen örnek o partiyi

temsil edebilmelidir. Alınacak paçal numune (parti veya alt partiden alınan birincil numunelerin tamamının birleştirilmesi ile elde edilen numune) birincil örneklerin yapısını bozmamalıdır. Örneğin kuru üzüm paketi birincil örnek olup bu bozulmamalıdır. Tahıl ve tahıl ürünlerinde (*Fusarium* toksinleri, Okratoksin A, Aflatoksin B1 ve toplam aflatoksin analizleri için) birincil örnek yaklaşık 100 g olmalıdır. Paçal örnek ağırlığı ise 10 kg civarındadır. Mikotoksinlerin dağılımı homojen olmadığı için, örnekler büyük bir dikkatle homojenize edilmelidir. Laboratuvara ulaşan numunenin tamamı homojenize edilmelidir. Öğütme işlemi ile tam bir homojenizasyon sağlanmalıdır. Homojenize olan örnekten 50 g'lık analitik porsiyonlarla analiz yapılmalıdır. Daha küçük miktarlar analitik hata verir. Aflatoksinler ultraviyole ışıktan etkilendiği için, analiz sırasında mümkün olduğunca gün ışığından kaçınılmalıdır.

## B. Metot validasyonu

Kullanılan kalıntı analiz metodu, metot validasyon kriterleri ile geçerli kılınmalıdır. Bu kriterler 1) Doğruluk 2) Uygulanabilirlik 3) Tespit sınırı 4) Tayin sınırı 5) Kesinlik 6) Geri alma 7) Seçicilik 8) Duyarlılık 9) Doğrusallık 10) Ölçüm belirsizliği 11) Matris etkisi olarak sıralanabilir (Tiryaki, 2006).

Metot validasyonu kriterlerinden hepsinin kalıntı analizlerinde özel önemi vardır. Ancak araştırmacıların en fazla üzerinde durdukları, kesinlik, ölçüm belirsizliği ve matris etkisidir. Kesinlik (precision) kriteri çok önemlidir. Tekerrür değerlerinin birbirine yakınlığının ifadesidir ve rastlantısal hataların bir ölçümüdür. Bir analitik metodun çalışma koşullarında

tekrar edilebilirliğinin ölçümüdür. Bu parametre 4 alt kriterde değerlendirilir. Bu değerlendirme metot, analist, ekipman ve laboratuvar kavramlarının aynı ve/veya farklı oluşlarına göre yapılır (Çizelge 3). Ancak kesinlik kriterinde belli limitler içinde olması gereken tekrar edilebilirlik (repeatability) ve yeniden üretilebilirlik (reproducibility) kavramlarının kalıntı analizlerinde anlamı büyüktür.

## Tekrar Edilebilirlik (Repeatability)

Bir laboratuvarda kısa aralıklarla tek bir analizcinin aynı ekipmanlarla yaptığı analizlerin mümkün olduğu kadar sabit koşullarda gerçekleştiğini gösterir. Aynı örnekte, aynı metot kullanılarak, aynı laboratuvar, aynı kişi, aynı ekipman ve farklı günlerde yapılan analizler arasındaki ilişkidir. Bu koşullarda yapılan iki analiz sonucu arasındaki mutlak farktır (genellikle % 95 olan belirli bir güven aralığında  $r = 2.8x$  sr içinde kalması beklenenin). Bu da prosedürde belirtilen range'i içerecek şekilde en az 9 veri ile yapılır. Örneğin, 3 seviye, her birinden 3 tekrar gibi.

## Yeniden Üretilebilirlik (Reproducibility)

Laboratuvarlararası yeniden yapılabilirliktir. Laboratuvarlar arasında yapılan ortaklaşa çalışmaların sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade eder. Aynı örnekte, aynı metot kullanılarak, aynı ekipman, farklı günlerde ancak farklı laboratuvarlarda farklı kişiler tarafından yapılan iki analiz sonucu arasındaki (genellikle % 95 olan belirli bir güven aralığında  $R = 2.8xsR$  içinde kalması beklenen) mutlak farktır. Elde edilen sonuçların relatif SD yüzdelerinin (CV) hesaplanması ile açıklanır. Kısaca RSD ile gösterilir.

Çizelge 3. Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası ölçüm hassasiyeti (precision) kriterleri (Tiryaki, 2011).

Table 3. Precision criteria within laboratory and interlaboratory (Tiryaki, 2011).

Laboratuvar içi Within laboratory			Laboratuvarlar arası Inter laboratory
Tekrar edilebilirlik Repeatability	Sağlamlık Robustness	Dayanıklılık Ruggedness	Yeniden üretilebilirlik Reproducibility
Aynı metot	Aynı metot	Metotta küçük bir sapma	Aynı metot
Aynı lab.	Aynı lab.	Aynı lab	Farklı lab
Aynı kişi	Farklı kişi	Aynı kişi	Farklı kişi
Aynı ekipman	Aynı ekipman	Aynı ekipman	Farklı ekipman
Farklı günlerde	Farklı günlerde		

RSDr = Tekrarlanabilirlik koşullarında elde edilen sonuçlardan hesaplanan oransal standart sapma,  $[(sr/x) \times 100]$

RSDR=Yeniden yapılabilirlik koşullarında elde edilen sonuçlardan hesaplanan oransal standart sapma,  $[(sR/x) \times 100]$

sr = Tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma

sR = Yeniden yapılabilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma

Mikotoksin kalıntı analizlerinde geri alımlar ve limitleri örnekteki mikotoksin konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Genellikle örnekteki konsantrasyon düştükçe geri alım da düşer. Bunlarla ilgili geri alım, tekrar edilebilirlik ve yeniden üretilebilirlik limitleri Çizelge 4 de verilmiştir.

### Ölçüm Belirsizliği (U)

ISO 17025 (Anonymous, 2005), ISO GUM (ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement) (Anonymous, 1995), ve EUREACHEM/ CITAC Guide CG4 (Anonymous, 2000) gibi uluslararası dokümanlara göre, laboratuvar işlemlerinin belirsizlik genişliklerinin ölçülmesi veya saptanması bir zorunluluktur.

Analizlerdeki ölçümler her zaman tam ve kesin değildir. Ancak bu kesin olmamanın derecesinin rakamsal olarak ifade edilmesi gerekir. Ölçüm belirsizliği bir ölçümün sonucu ile ilgili olası dalgalanmaları tanımlayan istatistiksel parametredir ve analizle ilgili her bir laboratuvar işlemlerinin ve test prosedürlerinin belirsizliğinin saptanarak birleştirilmiş toplam belirsizlik hesaplanması ile bulunur. Ölçüm belirsizliği, verilerin güvenilirliğini sağlayan kantitatif bir indikatördür. Bir sonuç ile ilişkili belirsizlik değerlendirmesi kantitatif analizlerin esas bölümüdür. Eğer bir sonucun, belirsizliği ile ilgili bilgi yoksa o sonuç eksik açıklanıyor demektir. Bu ölçüm belirsizliği değerinin çok düşük olması istenen bir olgudur, ancak bunun istatistiksel olarak doğrulanması gerekir (Anonymous, 2000; Barwick, 1998; Meyer, 2007). Analitik basamakların hepsi ayrı ayrı belirsizlik bileşenidir. Bunlar temel laboratuvar ekipmanlarının belirsizliği, ekstraksiyon belirsizliği

ve clean-up belirsizliğidir. Belirsizlik bileşenlerinden toplam belirsizliğe en fazla katkısı olanı da “clean-up” işlemidir. (Tiryaki ve Baysoyu, 2008).

### Matris Etkisi

Mikotoksin kalıntı analizlerinde analiz edilecek örnekten ekstraksiyon çözeltilisine geçen bileşikler matris etkisi oluşturarak kantitatif analizlerin sonucunu pozitif veya negatif yönde etkileyebilir. Bunun önüne geçmek için araştırmacılar çok alternatifler üzerine çalışmışlarsa da en uygulanabilir olanı matrisli kalibrasyon uygulamaktır. Örnek matrisli kalibrasyon, analiz edilecek ürün ekstraktı içinde hazırlanan standartların kullanılması ile yapılan kalibrasyon olarak tanımlanmıştır. Matris blank analizler için hazırlanmalıdır. Matris konsantrasyonu analiz edilecek örneğin konsantrasyonu ile aynı olmalıdır (Tiryaki, 2009).

### KABUL EDİLEBİLİR EN YÜKSEK MİKOTOKSİN MİKTARLARI

Bugün gelinen noktada insanları bu toksik grubun etkilerinden korumak amacıyla mikotoksinlerin gıda ve yemlerde bulunabilecek tolere edilebilir en yüksek miktarları yasal düzenlemelerle belirlenmekte, her ülkenin limit (sınır) değerleri farklı olsa da uluslararası ticarete belli normlara yaklaşmak için çaba sarf edilmektedir. Küresel anlamda her ülke coğrafi konumuna göre uluslararası kabul gören limitleri dikkate almalıdır. Bunlar arasında, Türk Gıda Kodeksi (Türk Kodeks, 2002), Codex Alimentarius (Codex, 2001), Avrupa Birliği EC NO 1881/2006 direktifi (Anonymous, 2006) ve Amerika FDA (Steyn ve Stander, 1999) limitleri sayılabilir. Türk Gıda Kodeksinde mikotoksinlerle ilgili limitler 2002/63 nolu tebliğ ve ekinde verilmiştir (Çizelge 5). Bu Türk Kodeksinden diğer bazı organizasyonların limitleri farklılık göstermektedir. Örneğin, aflatoksin kontrollerinde (findık ve antepfıstığı dahil) AB'nin uyguladığı tolerans limitleri (Anonymous, 2006) AFB1 için 2,2µg/kg, toplam aflatoksin (B1+B2+G1+G2) için 4 µg/kg iken, bu limitler Türk Gıda Kodeksi'ne (Codex, 2002) göre sırasıyla 5 ve 10 µg/kg'dir. Codex Alimentarius'da (Codex, 2001), işlenmemiş

yerfıstığında toplam aflatoksin limiti 15 ppb, sütte aflatoksin M1 0.05 µg/kg, elma suyunda patulin 50 µg/kg olarak Türk Gıda Kodeksi ile aynıdır. Çizelge 6'da AB Direktifinde bazı mikotoksinler

limitleri, Çizelge 7'de Amerikan Gıda İlaç Kurulu (FDA) tarafından aflatoksin kontaminasyonu için kabul edilen maksimum düzeyler (ppb) görülmektedir (Steyn and Stander, 1999).

Çizelge 4. Mikotoksin analizlerinde geri alm (%), tekrar edilebilirlik, yeniden üretilebilirlik limitleri (Anonymous, 2007).  
Table 4. Recovery (%), repeatability and reproducibility limits for mycotoxin analysis (Anonymous, 2007).

Mikotoksin Mycotoxin	Konsantrasyon Concentration (µg/kg)	Geri alma (%) Recovery (%)	RSDr(%)	RSDR (%)
Geri alma-Aflatoksin M1	0.01-0.05	60-120	Horwitz Değeri*	
	>0,05	70-110	Horwitz Değeri	
Geri alma-Aflatoksin B1, B2, G1,G2	<1.0	50-120	Horwitz Değeri	
	1-10	70-110	Horwitz Değeri	
	>10	80-110	Horwitz Değeri	
Okrotoksin A	<1	50-120	≤40	≤60
	1-10	70-110	≤20	≤30
Patulin	<20	50-120	≤30	≤40
	20-50	70-105	≤20	≤30
	>50	75-105	≤15	≤25
Deoksinivalenol	>100- ≤500	60-110	≤20	≤40
	>500	70-120	≤20	≤40
Zeralenon	≤50	60-120	≤40	≤50
	>50	70-120	≤25	≤40
Fumonisin B1 ve B2	≤500	60-120	≤30	≤60
	>500	70-110	≤20	≤30
T-2 Toksini	50-250	60-130	≤40	≤60
	>250	60-130	≤30	≤50
HT-2 Toksini	100-200	60-130	≤40	≤60
	>200	60-130	≤30	≤50

\* Kesinlik değerleri Horwitz denkleminde hesaplanmalıdır.  $RSDR = 2(1-0,5\log C)$ ; -RSDR Yeniden yapılabilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapmayı  $[(sR / x) \times 100]$ , C ise konsantrasyon oranını ifade eder. Horwitz eşitliği; analite ve matricke bağlı olmayan, yalnız analit konsantrasyonuna bağlı olarak değişen ve birçok rutin analiz metodu için geçerli olan genel bir kesinlik denklemdir.

Çizelge 5. Ülkemiz için geçerli olan gıda maddelerindeki maksimum mikotoksin seviyeleri (Türk Kodeks, 2002).

Table 5. Maximum mycotoxin levels in Turkish Food Codex (Türk Kodeks, 2002).

Gıda Maddesi Food	Maksimum düzey / Maximum level (µg/kg)			
	Aflatoksin Aflatoxin			Okrotoksin A Ochratoxin A
	B1	B1+B2+G1+G2	M1	
Fındık, yer fıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir üzüm ve kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5	10		
Tahıllar (karabuğday-.dahil) ve tahıl ürünleri	2	4		
Süt			0,05	
Süt tozu			0,50	
Peynir			0,25	
Bebek mamaları ve devam formülleri (süt bazlı)			0,05	
Bebek mamaları ve bebek gıdaları	1	2		
Baharat	5	10		
Diğer gıda maddeleri	5	10		
İşlenmemiş tahıl taneleri				5
Tahıllardan elde edilen bütün ürünler				3
Kuru üzüm				10
Elma suyu ve elma suyu içeren içecekler				50

Çizelge 6. AB Direktifinde verilen tahıl ve mısırlarda bazı mikotoksinler limitleri (Anonymous, 2006).  
Table 6. Limits of some mycotoxins in grain and maize in the EU legislation (Anonymous, 2006).

Gıda maddesi / Mikotoksin Food/ Mycotoxin	Maksimum düzeyler Maximum levels (µg/kg)	
<b>AFLATOKSİNLER (AF) (AFLATOXINS)</b>	B1	B1, B2, G1, G2
İnsan tüketimi öncesinde ayıklama veya diğer fiziksel uygulamalara tabi tutulan veya gıda maddelerine ilave edilen mısır	5,0	10,0
<b>OKRATOKSİN A (OTA) (OCHRATOXIN A)</b>		
İşlenmemiş tahıllar		5,0
Doğrudan işlenmiş tahıl ürünleri ve insan tüketimine sunulacak tahılları içeren işlenmemiş tahıllardan üretilen bütün ürünler		3,0
<b>DEOKSİNİVALENOL (DON) (DEOXYNIVALENOL)</b>		
İşlenmemiş mısır		1750
Doğrudan insan tüketimine sunulan tahıllar, tahıl unları (mısır unu, kabaca öğütülmüş mısır dahil), insan tüketimine sunulan kepek ve germeleri (bebek ve küçük çocuklar için üretilen işlenmiş tahıl bazlı ürünler hariç)		750
<b>ZERALENON (ZEARALENONE)</b>		
İşlenmemiş mısır		200
Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır unu, kabaca öğütülmüş mısır, mısır germi ve rafine mısır yağı		200
Mısır bazlı kahvaltılık tahıllar		50
Bebek ve küçük çocuklar için işlenmiş mısır bazlı gıdalar		20
<b>FUMONISİNLER (FUMONISINS)</b>	B1 ve B2 toksinleri toplamı Total B1 ve B2 toxins	
İşlenmemiş mısır		2000
Mısır unu, kabaca öğütülmüş mısır, mısır germi ve rafine mısır yağı		1000
Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır bazlı gıdalar (Mısır unu, kabaca öğütülmüş mısır, mısır germi ve rafine mısır yağı ile bebek ve küçük çocuklar için üretilen işlenmiş tahıl bazlı gıdalar hariç)		400
Bebek ve küçük çocuklar için üretilen işlenmiş tahıl bazlı gıdalar		200

Çizelge 7. Amerikan Gıda İlaç Kurulu (FDA) tarafından aflatoksin kontaminasyonu için kabul edilen maksimum düzeyler (ppb) (Steyn and Stander, 1999).

Table 7. Accepted maximum levels (ppb) of aflatoxins set by FDA (Steyn and Stander, 1999).

Substrat Substrate	Maksimum miktar Maximum level (ppb)
İnsan yiyeceği ve bazı tür hayvan yemleri	20
Süt	0.5
Besi Hayvanı Yemi	300
Domuz yemi (et için)	200
Süt veren inek, domuz ve kümes hayvanı yemi	100

### HIZLI ALARM SİSTEMİ (RASFF)

Uluslararası ticaretin bu denli arttığı günümüzde, dolaşımda olan tarımsal ürünlerin mikotoksinlerden arı olması önemlidir. AB ülkelerine gönderilen bitkisel ürün partilerinden uygun bulunmayanların sayısı ve uygun bulunmama nedenleri (pestisit

kalıntısı, toksin kalıntısı, küf, bakteri, böcek vb) günlük olarak AB'nin internet sayfasında yayınlanmaktadır. Türkiye'den AB ülkelerine gönderilen bitkisel ürün partilerinden mikotoksinler nedeniyle uygun olmayan parti sayıları 2004 den şu ana kadar Çizelge 8 de verilmiştir. Bunların çoğunluğu aflatoksin mikotoksinine aittir.

Çizelge 8. Türkiye'den AB ülkelerine gönderilen bitkisel ürün partilerinden mikotoksinler nedeniyle uygun olmayan parti sayıları (RASFF., 2011).

Table 8. RASFF information and alert notifications published in EU originated Turkey (RASFF., 2011).

Yıl Year	Uygun bulunmayanların sayısı Number of alert notification
2004	88
2005	129
2006	167
2007	198
2008	203
2009	179
2010	113
2011 (21 Mart'a kadar)	41

## SONUÇ

Mikotoksinler fungusların ürettiği biyolojik kökenli sekonder metabolitlerdir. Mikotoksinler üründe tarla safhasında oluşabildiği gibi, depolama sürecinde de oluşabilmektedir. Kalıntı analizlerinde ise, pestisit kalıntı analizlerinde geçerli olan tüm analitik işlemler mikotoksinler için de geçerlidir. Bunlar örnek alma, örnekleme, homojenizasyon, ekstraksiyon, clean-up ve kromatografik yöntemlerdir. Yine son yıllarda, laboratuvarıda üretilen verilerin güvenilirliğini sağlayan, kalite kriterleri mikotoksinler için de geçerlidir. Mikotoksin analizlerinde TLC ve HPLC kullanımı GCye göre daha yaygındır. Birden fazla mikotoksinin aynı sistem ile analiz edilmesine yönelik -çoklu kalıntı analiz metodu- çalışmalar son yıllarda yoğunlaşmıştır.

## LİTERATÜR LİSTESİ

- Anonim, 2010a. Kalkan, M., Sütte görünmez tehlike: AFLATOKSİN M1, ([http://tarimkutuphanesi.com/Sutte\\_gorunmez\\_tehlike:\\_AFLATOKSIN\\_M1\\_Mucahit\\_KALKAN\\_Ziraat\\_Muhendisi\\_01587.html](http://tarimkutuphanesi.com/Sutte_gorunmez_tehlike:_AFLATOKSIN_M1_Mucahit_KALKAN_Ziraat_Muhendisi_01587.html)) 22.10.2010.
- Anonim, 2010b ([http://www.aydintarim.gov.tr/hastalik\\_ve\\_zararlılar/kanatlılarda\\_Fungus.htm](http://www.aydintarim.gov.tr/hastalik_ve_zararlılar/kanatlılarda_Fungus.htm)) Erişim Tarihi: 22.10.2010.
- Anonymous. 2003. European Commission. Commission Directive 3003/100/ EC of 31 October 2003 amending Annex I to directive 2002/32/ EC of the European Parliament and of the council on undesirable substances in animal feed. Official Journal of the European Communities. L285: 33-37.
- Anonymous. 2006. European Commission. Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities. L364: 5-24.

- Anonymous. 1995. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISO, Geneva, ISBN:92-67-10188-9.
- Anonymous. 2000. EURACHEM/CITAC Guide CG 4.(2000) Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, 2<sup>nd</sup>Edn. (<http://www.measurementuncertainty.org/mu/QUAM2000-1.pdf>) (07.04.2008).
- Anonymous. 2005. International Organization For Standardization, ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, Geneva.
- Anonymous. 2007. Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama Ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği, Yetki Kanunu Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Yayımlandığı -26504, Tebliğ No: 2007-21.
- Ayaz, A. ve M. Yurttagül. 2008. Besinlerdeki Toksik Öğeler-I, Hacettepe Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 727.
- Aydın, N. 2010. Hayvan Sağlığında Mikotoksinler Ve Mikotoksikozisler, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, ([http://infeksiyon.dergisi.org/pdf/pdf\\_INF\\_220.pdf](http://infeksiyon.dergisi.org/pdf/pdf_INF_220.pdf)) Erişim Tarihi: 22.10.2010.
- Barwick, V. J. 1998. VAM Project 3.2.2 Evaluating Confidence in Analytical Measurement. Part (a): Literature review of uncertainty in laboratory operations. Review of sources of uncertainty in gas chromatography and high performance liquid chromatography. LGC/VAM/1998/053. Setting Standards in Analytical Science.
- Basmacıoğlu, H. ve M. Ergül. 2003. Yemlerde Bulunan Toksinler ve Kontrol Yolları, Hayvansal Üretim 44(1): 9-17.
- Berthiller, F., M. Sulyok, R. Krska, and R. Schuhmacher. 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. International Journal of Food Microbiology. 119 (1-2): 33-37.
- Campbell, A. D., T. B. Whitaker, A. E. Pohland, J. W. Dickens, and D. L. Park. 1986. Sampling, sample preparation and sampling plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. Pure & Appl. Chem. 58 (2): 305-314.
- Codex 2001. Codex Alimentarius. Maximum level for aflatoxin M1 in milk. Codex Stand. 232.
- Erzurum, K. 1996. İnsan ve Hayvanlara Toksik Fungus Metabolitleri” Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 1460.
- Fels-Klerx, H. J., M. C. Kandhai, and C.J.H. Booij. 2008. A conceptual model for identification of emerging risks, applied to mycotoxins in wheat-based supply chains. World Mycotoxin Journal, February; 1(1): 13-22.
- Girgin, G. 2001. Dünyada ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler, Mycotoxins in Turkey and the World, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 58 (3): 97-118.

- Karabulut, Ö. A. ve T. Değirmencioğlu. 2002. Hayvan Yemi Olarak Kullanılan Buğday Danelerinde Toksin Oluşumuna Neden Olan Fungusların Sodyum Hidroksit Uygulamasıyla Engellenmesi, Uludağ Üniv. Zir. Fak. Derg. 16: 129-138.
- Kielstein, P. 1993. Pilze als Krankheitserreger bei Mensch und Tier. In: Allgemeine Mikologie (ed. Weber, H.). Gustav Fischer Verlag Jena-Stuttgart. 467-505.
- Meyer, V. R. 2007. Measurement Uncertainty Journal of Chromatography A. 1158 (1-2): 15-24.
- Nielsen, K. F., and J. Smedsgaard. 2003. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology, Journal of Chromatography A, 1002: 111-136.
- Oruç, H. H. 2005. Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri, Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med, 24(1-2-3-4): 105-110.
- RASFF. 2011. (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>).
- Sabuncuoğlu, S. A. 2008. Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28 (1): 63-92.
- Seçer, E. 2000. Açık Alanlarda Depolanan Buğdaylarda Gelişen Funguslar ve Bunların Oluşturduğu Toksinler Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi. 122 s., Ankara.
- Sforza, S., C. Dall'Asta, and R. Marchelli. 2006. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry, Mass Spectrom. Rev. 25, 54–76.
- Siegel, D., M. Feist, M. Proske, M. Koch, and I. Nehls. 2010. Degradation of the *Alternaria* Mycotoxins Alternariol, Alternariol Monomethyl Ether, and Altenuene upon, J. Agric. Food Chem., 58: 9622–9630.
- Smith, J. E., and M. O. Moss. 1985. Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance. John Wiley and Sons. New York. 146 p.
- Soares, L. M. V., and D. B. Rodriguez-Amaya. 1989. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone and Sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic method. Journal - Association of Official Analytical Chemists., 72 (1): 22-26.
- Spanjer, M., P. Rensen, and J. Scholten. 2006. Multi-mycotoxin analysis by LC-MS/MS in a single sample extract, Proceedings of the XIth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Bethesda, Maryland USA, May 17–21, 2004, Wageningen Academic Publishers, 117-124.
- Steyn, P. S., and M. A. Stander. 1999. Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, eds. General and Applied Toxicology. 2nd Edition. United Kingdom: Macmillan Reference Ltd.: 2145-76.
- Sulyok, M., F. Berthiller, R. Krska, and R. Schuhmacher. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize, Rapid Communications in Mass Spectrometry. 20: 2649-2659.
- Suttajit, M. 2000. Prevention and Control of Mycotoxins. FAO Document Catalogue Accession No: 329418. p. 351-362.
- Şenyuva, H. Z., J. Gilbert., Ş. Özturkoğlu, S. Özcan, and N. Gürel. 2008. Changes in Free Amino Acid and Sugar Levels of Dried Figs during Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. J. Agric. Food Chem., 56: 9661-9666.
- Tanaka, T., A. Yoneda, S. Inoue, Y. Sugiura, and Y. Ueno. 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A 882: 23-28.
- Tiryaki, O. 2006. Method validation for the analysis of pesticide residues in grain by thin-layer chromatography. Accreditation and Quality Assurance, ISSN:0949-1775, 11 (10): 506-514.
- Tiryaki, O. 2009. Pestisit kalıntı analizlerinde örnek matrisi sorunu ve çözüm yolları. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 25 (1-2): 456-478.
- Tiryaki, O. 2011. "Pestisit Kalıntı Analizlerinde Kalite Kontrol (QC) ve Kalite Güvencesi (QA)" Erciyes Üniv. Yayın No: 182; Erciyes Üniv. Seyrani Ziraat Fakültesi Yayın No: 2, Nobel Yayınevi.
- Tiryaki, O., and D. Baysoyu. 2008. Estimation of efficiencies and uncertainties of the extraction and cleanup steps of the pesticide residue determination in cucumber using <sup>14</sup>C-carbaryl. Accreditation and Quality Assurance, 13(2): 91-99.
- Tunail, N. 2000. Funguslar ve Mikotoksinler, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s 03. Bölüm, 13. Kısım.
- Türk Kodeks. 2002. Türk Gıda Kodeksi. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, Tebliğ No: 2002/63, Ek-1 Mikrobiyal Toksinler.
- Uçkun, Z. 2008. Güney Marmara Bölgesi Mısır Alanlarında Sap ve Koçan Çürüklüğüne Neden Olan Fusarium Türleri, Dayanıklılık Kaynaklarının Saptanması. Ege Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bitki Kor. Böl. A.B.D., Doktora Tezi, 185 s.
- Yıldız, G. 2009. Türkiye'de çeşitli hayvancılık işletmelerinde kullanılan karma yemlerin ve yem hammaddelerinin okratoksin A kirliliği yönünden incelenmesi, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 56: 131-135.