



A kép illusztráció / Picture is for illustration only  
Fotó/Photo: Shutterstock

Tima Helga<sup>1</sup>, Kecskésné Nagy Eleonóra<sup>2</sup>, Rácz Anita<sup>3</sup>, Kiskó Gabriella<sup>1</sup>  
Mohácsiné Farkas Csilla<sup>1</sup>

Érkezett: 2016. november – Elfogadva: 2017. május

## Takarmányozásra használt növényi alapanyagok DON, F-2, T-2 mikotoxin-vizsgálata ELISA-módszerrel

**Kulcsszavak:** takarmány, ELISA, deoxinivalenol, zearalenon, T-2 mikotoxin

### 1. Összefoglalás

Tanulmányunkban különböző állatfajok etetésére használt növényi alapanyagokat vizsgáltunk kompetitív ELISA-módszerrel. A vizsgálatok során takarmányozáshoz leggyakrabban használt alapanyagokkal (szója- és lucerna-pellet, valamint búza, árpa és kukorica) dolgoztunk. A *Fusarium* mikotoxinok közül a deoxinivalenol (DON), zearalenon (F-2) és a T-2 toxinokat mértük. A mérési eredményeinket RStudio matematikai-statisztikai programmal értékeltük. Kísérletünkben megállapítottuk, hogy mindhárom vizsgált mikotoxin detektálható - volt mindegyik mintában, de nem mindegyikben volt mennyiségileg elfogadható pontossággal meghatározható érték. A detektált DON toxin eredmények átlagértéke egy nagyságrenddel nagyobbak bizonyult a többi toxinnál. Vizsgálatunk során bizonyítást nyert, hogy a deoxinivalenol, zearalenon és T-2 mikotoxinok jelenléte komoly takarmány- és élelmiszer-biztonsági veszélyt jelent, hiszen ha csak kis mennyiségekben is, de jelen vannak már a takarmány-alapanyagokban. Napjainkban egyre több esetben fordul elő ezen mikotoxinok együttes jelenléte, ami nagymértékben sokszorozza az előbb említett kockázatot.

### 2. Bevezetés

A természetes eredetű szennyeződésekhez tartoznak a mikroszkopikus gombák által termelt mikotoxinok, amelyek a penészgombák másodlagos anyagcsere-termékei. A mikotoxinok humán- és állategészségügyi jelentősége kiemelkedő [1]. A jelenleg is zajló klímaváltozás miatt a toxinok előfordulásának kockázata az élelmiszerláncban nagy jelentőséggel bír. Az IPCC (az ENSZ Éghajlat-változási Kormányközi Testülete) és a Meteorológiai Világszervezet (WMO) állásfoglalásai, a VAHAVA (VÁltozás-HATás-VÁlasztás) elnevezésű kutatási program, valamint az Országgyűlés által elfogadott Nemzeti Éghajlat-változási Stratégia megállapításai alapján: „a Kárpát-medencében fokozottan érvényesülő klímaváltozás várható” [2]. Ez a folyamat hátrányosan érintheti a hazai mezőgazdaságot a termésmennyiségek várható kiesése miatt, kedvezőtlen hatású lehet az élel-

mezés- és élelmiszer-biztonságra a kártékony mikroorganizmusok elszaporodásának következtében, valamint a humán- és állategészségügyre is közvetett hatással lehet. A globális klímaváltozás elősegítheti a mikotoxinokat termelő penészgombák szaporodását [2]. A mikotoxinnal szennyezett takarmánnyal etetett állatok komoly élelmiszer-biztonsági veszélyt jelentenek, így a belőlük készített termékek elfogyasztása is kockázatos lehet, valamint a toxint tartalmazó takarmányokat fogyasztó állatok fejlődése visszaesik, súlygyarapodása lassul, és szaporodásbiológiai, állategészségügyi kondícióik is romlanak. A kedvezőtlen állategészségügyi jellemzők negatív hatást gyakorolnak az állattenyésztésre, így a gazdasági hatékonyság és a termelési mutatók is csökkenhetnek [3].

A mikotoxinok kutatása az utóbbi évtizedben egyre inkább az érdeklődés középpontjába kerül. Több kísérletet végeznek annak érdekében, hogy csök-

<sup>1</sup> Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

<sup>2</sup> Pallasz Athéné Egyetem, Kertészeti és Vidékfejlesztési Kar

<sup>3</sup> Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék

kenteni lehessen a toxinok bekerülésének esélyét az élelmiszerláncba. Arra vonatkozóan is vannak vizsgálatok, hogy az elvárt vagy megengedett határértéken belül előforduló szennyeződések (pl. alapanyagok esetén) még alacsonyabb szintre lehessen mérsékelni. A toxinok élelmiszerláncba bekerülési esélyét a gabonafélék termesztése során alkalmazott megelőző agrotechnikai műveletekkel lehet minimalizálni [4]. Ezek közül kiemelhető a legelterjedtebben alkalmazott kémiai növényvédelem, amelynek hatékonyságát és hatásosságát Mesterházy és munkatársai [5] vizsgálták. Ugyancsak említésre méltó az egyre szélesebb lehetőségeket biztosító biológiai növényvédelem, amelynek alkalmazása során a kórokozók a természetes ellenségekkel szoríthatók vissza [6]. A megelőző védekezésben fontos tényező a fajtaválasztás, és e tekintetben igen hangsúlyos szerepet kap a fajtanemesítés, azaz a rezisztens vagy toleráns gabonafajták előállítása [7], [8].

A megelőző agrotechnikai műveletek hatékonysága és hatásossága nagymértékben függ az évjáráthástól és a technológiai fegyelemtől, ahogy azt az elmúlt évek tapasztalatai is mutatják. A *Fusarium* gomba szaporodásához kedvező évjáratokban fel kell készülni arra, hogy toxinnal különböző mértékben szennyezett búzatételek betakarítására kell számítani. Az ilyen évjáratokban annak kockázata is növekszik, hogy a takarmányok nagyobb mértékben lesznek toxinokkal szennyezettek, mint az élelmiszeripari alapanyagok. Ennek alapvető oka, hogy az élelmiszer-előállításban nagyon szigorú jogszabályi előírásokat betartva kell kiválasztani az alapanyagokat. Azokat a gabonatételeket, amelyek pl. a toxinszennyezettségük miatt nem felelnek meg a kritériumoknak, takarmánnyá minősíthetik. Ennek ismeretében kiemelt szerepük van azoknak a kutatásoknak, amelyeknek célja a betakarítást követő időszakban a toxinkoncentráció csökkentése. Az állati takarmányozásban az egyik ilyen lehetőség a takarmányokhoz olyan anyagok hozzáadása, amelyek képesek megkötni az állati szervezetet károsító toxinokat. Bata [3] beszámol arról, hogy toxinetési kísérleteket végeznek különböző korcsoportú sertés-

seken, szarvasmarhák, tojtyúk, pulykák, és követik egészségügyi állapotuk változásait. A kísérletek során bizonyítást nyert, hogy a fuzariotoxikózis kevert tünetekben mutatkozik meg, továbbá a fuzariotoxinok iránt legérzékenyebb állatfaj a sertés és a baromfi. Ezen fajoknál szaporodásbiológiai zavarokat valamint az immunrendszer legyengülése következtében másodlagos megbetegedéseket okoztak. A szarvasmarha kevésbé érzékeny ezekkel a toxinokkal szemben, mint a sertés.

A betakarítást követő időszakban a gabona korszerű berendezésekkel történő tisztításával is van lehetőség a toxintartalom csökkentésére. A színválogatás és a felülettisztítás hatékonyságát elsődlegesen élelmiszeripari alapanyagokon vizsgálják [9], [10], de van lehetőség ezek alkalmazására a takarmányozáshoz felhasznált anyagok előkészítésénél is, amennyiben az indokolt. Kecskésné és munkatársai [11] felhívják a figyelmet arra, hogy a malomipari felhasználásra szánt búza őrlés előtti színválogatása során a malmi búza mellett képződött frakció, azaz az úgynevezett melléktermék DON-toxin tartalma minden esetben megnövekszik a kiinduló, tisztítatlan búza-tétel toxintartalmához képest. A növekedés mértéke viszont nem mutat korrelációt sem a kiinduló alapanyag toxintartalmával, sem a tisztítás hatékonyságával, ugyanis egyéb, előre nehezen meghatározható tényezők is befolyásolják azt. Ezt azért fontos tudni, mert az említett mellékterméket takarmánnyá, illetve takarmánykeverékek alkotójaként hasznosítják. A kísérleti eredmények szerint mindenképp javasolt a felhasználás előtt a melléktermék toxintartalmának a mérése, hogy a takarmányok toxinszennyezését elkerülhessük.

A tápláléklánc csúcsán álló ember joggal várhatja el, hogy a termék, amely az asztalára kerül, kielégítse az egészségmegőrzés és betegségmegelőzés szempontjából megfogalmazott igényeit. Kiemelt feladat az élelmiszer-biztonság fenntartása, vagyis a nem biztonságos termékek kiszűrése, kivonása a gyártói, kereskedelmi forgalomból.



A kép illusztráció / Picture is for illustration only.  
Fotó/Photo: Shutterstock

A DON, F-2 és T-2 mikotoxinok okozta takarmány és takarmányipari alapanyagok – elsősorban gabonafélék – szennyezettsége világszerte komoly élelmiszer-biztonsági kihívást jelentett és jelent ma is [12]. Németországban egy korábbi, búzamintákon végzett ( $n=84$ ) kutatás szerint a DON mikotoxinok értékei 4,0 - 20500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  közötti tartományban voltak mérhetőek, az F-2 toxin 1,0 - 8040  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a T-2 3,0 - 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  között mennyiségben volt kimutatható [13]. Lengyelországban 1990-ben, szintén búzamintákat vizsgálva a DON toxin szennyezettség 2000 - 40000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  között alakult, míg a zearalenon toxin ennél a tartománynál kevesebb volt, mennyiségét 10 - 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  közötti értékeknek találták [14]. Kukorica esetében - ugyanakkor Lengyelországban - kizárólag deoxinivalenol toxint vizsgáltak, és a minták szennyezettsége nagyobb mértékűnek bizonyult a búzáénál. Itt az értékek 4,0 - 320  $\text{mg}/\text{kg}$  között alakultak [12]. Finnországban állati takarmányok és gabonák (kukorica, búza, árpa) DON szennyezettsége 7,0 - 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  volt, a minták F-2 toxin értékei 22,0 - 95,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  között alakultak [15], amelyek lényegesen alacsonyabbak az előzőeknél. Az adatok azt mutatják, hogy a toxinkoncentráció egy adott területen és időszakban nagy eltéréseket mutathat. Ennek megfelelően az élelmiszer-biztonsági feltételeket csak akkor lehet megbízhatóan teljesíteni, ha kidolgozzuk a takarmány-alapanyagok toxinszintjének ellenőrzési rendszerét és annak keretén belül folyamatosan mérjük a toxinszinteket.

A takarmányok penészgombákkal való szennyezettsége nem jelenti minden esetben a mikotoxinok jelenlétét is [16], [17]. A pontos mikotoxin-szennyezettség megítéléséhez kellően érzékeny és specifikus analitikai módszerekre van szükség. Általánosságban elmondható, hogy bármely mikotoxin kimutatása igen bonyolult, idő- és költségigényes folyamat, amelynek pontossága nagymértékben függ a mintavétel és minta-előkészítés helyességétől, illetve hatékonyságától [16]. A meghatározási módszerek kezdetben vékonyréteg kromatográfiára épültek, majd gáz- és folyadék kromatográfián alapultak [18], [19]. Ezeket egészítették ki a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) módszerek [19]. Ezek mellett a nagyhatékonyságú analitikai módszerek mellett rutin jellegű, immunanalitikai eljárásokat is kifejlesztettek egyes mikotoxinok mennyiségi és minőségi meghatározására [20], [21].

Az utóbbi években az ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszer fluoreszcenciás és tömegspektrometriás válfajainak előretörése figyelhető meg [22]. A jelenleg alkalmazott vizsgálati módszereket három nagy csoportba sorolhatjuk: gyorsmódszerek, elválasztás technikák, immunológiai eljárások.

A mikotoxinok kimutatásának azonban vannak újabb felismert korlátai is, ezek elsősorban a maszkolt és kötött toxinokra értendők. A maszkolt mikotoxinok meghatározásának nehézsége megváltozott fizi-

kokémiai sajátágaikból adódik, amelynek következménye lehet az eltérő extrahálhatóságuk. Emiatt a szokásos vizsgálati módszerek alkalmazásakor ezek kvantifikálása bizonytalan, a kötött toxinoké pedig nem lehetséges [23].

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Anyagok

Vizsgálatainkhoz a takarmány-alapanyagokat két csoportba rendeztük. Az első vizsgálati csoportban a zöld növényi részekből előállított szója ( $n=10$ ) és lucerna pelletből ( $n=10$ ) vizsgáltunk összesen 20 mintát. Ugyancsak 20 mintával dolgoztunk a második vizsgálati csoportban is. Itt a gabonafélék magvainak, konkrétan búzának ( $n=10$ ), árpának ( $n=5$ ) és kukoricának ( $n=5$ ) a toxintartalmát mértük meg. Így az összes mintaszámunk  $n=40$  volt. A takarmány-alapanyagok gyors, tájékoztató mikotoxin-felmérése kompetitív ELISA-módszerrel, Ridascreen Fast kitékkel (R-Biopharm) történt. Az általunk használt gyors tesztek „lel-két” a standard oldatok jelentették, amelyeket a kiték a toximméréshez igazodóan tartalmaztak. A DON kit: RIDASCREEN® FAST DON (Art. No.: R5902, 48 wells), standard oldatok: „mikotoxint nem tartalmazó vak oldat”  $\text{mg}/\text{kg}$ , 0,222  $\text{mg}/\text{kg}$ , 0,666  $\text{mg}/\text{kg}$ , 2  $\text{mg}/\text{kg}$ , 6  $\text{mg}/\text{kg}$ . A zearalenon kit: RIDASCREEN® FAST ZEARALENON (Art. No.: R5502, 48 wells) standard oldatok: „mikotoxint nem tartalmazó vak oldat”  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . A T-2 kit: RIDASCREEN® FAST T-2 (Art. No.: R5302, 48 wells) standard oldatok: „mikotoxint nem tartalmazó vak oldat”  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Mérésünkhöz Metertech-500 spektrofotométert (ELISA Reader) használtunk (hullámhossz 450 nm). A módszerek validálásához szükséges standard oldatok gyártója: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Németország). Az eredmények értékelése speciális szoftver segítségével történt: RIDA® SOFT WIN (Art. No.: Z9999). A statisztikai analízist RStudio (Version 0.98.953) program segítségével végeztük.

#### 3.2. Minta-előkészítés

Mintáink légszáraz állapotúak voltak, ezért nem volt szükség további szárításra. A vizsgálati mintarészeket 1,0 mm szemcse méretű darálón (Tecator, Sweden) homogenizáltuk. A minta-előkészítés DON, F-2, T-2 mikotoxinokra a gyártó által mellékelt útmutatás szerint történt (R-Biopharm). DON mikotoxin esetében zárható üvegtégelybe bemértünk 5 gramm mintát (őrölt, elegyített), majd 100 ml desztillált vízzel 30 percig rázógépen (Tecator) erősen ráztuk az oldatot. Az elegyet üvegtölcsérbe helyeztünk Whatman 1-es szűrőn leszűrtük 100 ml-es Erlenmeyer lombikba. A leszűrt elegyből 50  $\mu\text{l}$ -t használtunk a teszthez: RIDASCREEN® FAST DON.

F-2 és T-2 mikotoxinok esetében azonos a minta-előkészítési protokoll, vagyis ugyanabból a munkaoldatból használtunk a tesztekhez. Bemértünk 5 gramm

mintát, amelyet 100 ml-es lombikba töltöttünk, és 25 ml 70%-os MeOH adtunk hozzá, majd 30 percig rázógépen erősen kevertettük az oldatot. Az elegyet üvegtölcsérben Whatman 1-es szűrőn leszűrtük 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba. A szűrletből 1 ml-t kivettünk, melyhez 1 ml desztillált vizet adtunk, ebből a hígított mintából 50 µl-t használtunk a tesztekhez: RIDASCREEN® FAST ZEARALENON, RIDASCREEN® FAST T-2.

### 3.3. Módszervalidálás

A kitek mikotoxinok kvantitatív analízisére való megfelelésségét több releváns szervezet tanúsítványa igazolta: AOAC, Association of Official Chemists (AOAC International/Research Institute – PTM/Performance Tested Methods), FGIS (Federal Grain Inspection Services - program of the Grain Inspection), USDA/GIPSA (Packers and Stockyards Administration of the United States Department of Agriculture).

A DON toxin mérési módszervalidálása a gyártó által tanúsítványban leírt gabonákra és más növényi alapanyagokra, kukorica, búza, árpa, maláta, búzakarpa, cirok, búzapehely, búzaliszt, szójaliszt, szójapehely, lucerna, valamint gabona alapú takarmányokra történt. A gyártó által megadott detektálási határ (LOD): 0,15 mg/kg, a mennyiségi meghatározás határa (LOQ): 0,20 mg/kg. Az F-2 toxin, mérési módszer

validálása gabonákra: kukorica, búza, árpa, zab, valamint keverék-takarmányokra történt. A gyártó által megadott detektálási tartomány 17-41 µg/kg, az alsó méréshatár LOQ: 50 µg/kg volt. A T-2 toxin, mérési módszer validálását kukorica, valamint sertés és baromfi tápokkal, mint keverék takarmányokkal végezték. A gyártó által megadott határok a következők voltak: LOD: 20 µg/kg, LOQ: 50 µg/kg. A kitekhez mellékelt tanúsítványok szerint megadott detektálási határokat és a mennyiségi meghatározás alsó határait az **1. táblázatban** foglaltuk össze.

Mi is elvégeztük a mérési módszerek validálását, amelynek során mindegyik mikotoxin detektálási határának (LOD) meghatározásához n=10 búza mintát (vak / blank) használtunk, a gyártó által leírt minta és mérésre való előkészítés szerint. Erre azért volt szükség, mert LOD feletti koncentrációs eredményeket használtunk fel az értékelés és adatelemzés során. Az LOD kalkulációja a vizsgált minták abszorbancia alapján a kalibrációs görbék segítségével számított koncentrációs átlag értékéből és az ezekhez tartozó szórás (SD=standard deviation) értékekből történt.

$$LOD = (\text{vakminta számított átlag-koncentráció}) + (\text{mérési eredmények } /SD/ \text{ szórásának kétszerese})$$

A visszanyerési % meghatározását három különböző koncentráció szinten végeztük el (50, 100, 200 µg/kg).

1. táblázat. A gyártó által (R-Biopharm) megadott alsó mérési és detektálási határok.  
Table 1. Limits of detection and quantification, provided by the manufacturer (R-Biopharm)

Teszt típus Test type	Detektálási határ (LOD) Limit of detection (LOD)	A mérés alsó határa (LOQ) Limit of quantification (LOQ)
DON teszt / DON test	0,2 mg/kg	0,2 mg/kg
F-2 teszt / F-2 test	17- 41 µg/kg	50 µg/kg
T-2 teszt / T-2 test	20 µg/kg	50 µg/kg

LOD: A detektálás alsó határa (Limit of detection)  
LOQ: A mennyiségi mérés alsó határa (Limit of quantification)

2. táblázat. ELISA módszer validálási eredményei.  
Table 2. ELISA method validation results

Mikotoxin Mycotoxin	LOD (µg/kg)	Adagolt (spiked) koncentráció Spiked concentration (µg/kg)	Visszanyerés Recovery (%)	Átlag visszanyerés számoláshoz Average recovery for calculation (%)	CV (%)	Köztes pontosság Intermediate precision (%)	CV (%)
DON	13	50	92,0	92,3	4,3	92,4	6,0
		100	95,6		5,1	96,5	5,9
		200	89,4		5,7	87,8	6,2
F-2	17	50	85,3	89,3	3,9	86,9	6,8
		100	92,5		4,4	90,2	6,5
		200	90,1		5,7	93,4	6,8
T-2	12	50	97,5	97,3	3,4	96,9	7,0
		100	98,1		5,4	94,5	7,1
		200	96,3		5,5	93,7	6,7

LOD: A detektálás alsó határa (Limit of detection)  
CV: Variációs koefficiens (Variation coefficient)

A kontroll búza mintáinkhoz 500 µg/l-t adagoltunk az általunk készített mikotoxin standard munkaoldatból úgy, hogy beállítsuk a becsült három koncentráció-szintet. Minden koncentráció esetén és naponta hat ismétléssel dolgoztunk.

$$\text{Visszanyerési } \% = 100 \times (\text{mért tartalom/erősített szint})$$

A köztes pontosság (intermediate precision), helyesség meghatározása érdekében ugyanezeket a lépéseket még két alkalommal megismételtük. Összesen 3 alkalommal mértünk le minden mikotoxint minden koncentrációban. A vizsgálatok két hónap alatt zajlottak le, két különböző vizsgálószemély bevonásával, ugyanabban a laboratóriumban, ugyanazokkal az eszközökkel. A precizitás a mérés véletlenszerű változásait jellemző adat, amely többek között a laboratóriumon belüli variabilitással is leírható.

$$H = X_{\text{mért}} - X_{\text{ref}}$$

Ahol  $H$  a helyesség, pontosság amely egyenlő a mért ( $X_{\text{mért}}$ ) és a referencia érték ( $X_{\text{ref}}$ ) különbségével, ha rendelkezésre áll CRM (hiteles vagy tanúsított referencia minta). Az  $X_{\text{ref}}$  értékét CRM híján magunk határoztuk meg.

Mindegyik vizsgált mikotoxin (DON, F-2, T-2) validációs paramétereinek meghatározásához búzamintákat használtunk. Eredményeinket a **2. táblázatban** foglaltuk össze.

Az adatok a következőképpen alakultak: DON mikotoxin LOD: 13 µg/kg, F-2 toxinnál 17 µg/kg, T-2 esetében 12 µg/kg volt. A visszanyerés 85,3- 98,1% között alakult, a variációs koefficiens (CV) 3,4- 5,7%. Köztes pontosság: 86,9- 96,9%, CV: 5,9- 7,1%. A vizsgálataink során megadott koncentrációs értékek számítása az adott mikotoxin-átlagérték visszanyerése alapján történt. A visszanyerés elfogadhatósági kritériumai szerint 0,01 mg/kg koncentráció esetében 60-115 % között, 0,1 mg/kg esetében 80-110 % között kell lennie az értékeknek (882/2004/EK rendelet III. mellékletének 1. és 2. tételében foglalt ren-

3. táblázat. Detektált mikotoxin-koncentrációk (>LOD) értékelése az összes mintára vonatkoztatva (szója, lucerna pellet), RStudio matematikai-statisztikai programmal.  
Table 3. Evaluation of the detected mycotoxin concentrations (>LOD) for all samples (soy, alfalfa pellet), using the RStudio mathematical-statistical program

DON µg/kg	F-2 µg/kg	T-2 µg/kg
Min.: 15.0	Min.: 43.00	Min.: 13.00
1st Qu.: 48.0	1st Qu.: 74.00	1st Qu.: 18.00
<b>Medián / Median: 568.0</b>	<b>Medián / Median: 85.00</b>	<b>Medián / Median: 45.00</b>
<b>Átlag / Mean: 605.0</b>	<b>Átlag / Mean: 89.00</b>	<b>Átlag / Mean: 46.00</b>
3rd Qu.: 1105.0	3rd Qu.: 108.00	3rd Qu.: 69.00
Max.: 1400.0	Max.: 134.00	Max.: 83.00

LOD: A detektálás alsó határa (Limit of detection)  
1st Qu.: Első kvartilis (First quartile)  
3rd Qu.: Harmadik kvartilis (Third quartile)  
Min.: minimum  
Max.: maximum

delkezéseknek kell megfelelniük). A mi esetünkben a visszanyerés elfogadható volt. A T-2 kit esetében azonban a HT-2 toxin keresztreakcióját figyelembe kell venni, és a gyártó által meghatározott keresztreakcióval számolni kell. A tesztfolyamatokat, lépéseket a gyártó vagy forgalmazó által mellékelt útmutatás szerint hajtottuk végre (R-Biopharm, D.G.).

### 4. Eredmények és értékelésük

A mikotoxin-vizsgálatok előtt öt pontos standard kalibrációt végeztünk a tesztekhez mellékelt standard oldatokkal. A kalibrációs görbék korrelációs együtthatói ( $R^2$ ) DON toxin kalibráció esetében: 0,9962; F-2 kalibráció: 0,9998 és T-2 kalibráció esetében: 0,9943 volt. A kalibrálás lineáris, ha a korrelációs együttható ( $R^2$ ) magasabb, mint 0,990. Szója esetében DON és T-2 toxinokra nézve az összes minta vizsgálati eredménye a mérési határ alatt (<LOQ) volt, de a toxinok detektálhatóak (>LOD) voltak. Az F-2 toxin a szójaminták 60%-ában volt mennyiségileg (>LOQ) meghatározható. A lucernapellet-minták esetében mind a három toxinnál 100%-ban LOQ felett voltak a koncentrációk. Az RStudio szoftver (RStudio Inc.) [24] segítségével kiértékelt adatok a **3. táblázatban** láthatók. Ebben a táblázatban az összes vizsgált minta mikotoxin-koncentrációinak statisztikai értékelését látjuk, amely azt mutatja, hogy a DON mikotoxinok medián és átlagértéke egy nagyságrenddel nagyobb a zearalenon és T-2 mikotoxinokénál, melyek minden esetben detektálhatóak (>LOD) voltak.

Az alacsony mintaszám, a DON és a másik két mikotoxin medián értékeinek nagy különbsége miatt az eloszlások illetve a normalitás vizsgálata a nagy bizonytalanság miatt nem tehető meg. Ha a normális eloszlás nem bizonyítható, akkor a medián értékek összehasonlítására használhatjuk a Wilcoxon tesztet. A vizsgált mintákra nézve az F-2 és a T-2 mikotoxinok medián értékei nem különböznek szignifikánsan egymástól ( $p=0,0926$ ;  $p > 0,05$ ), de a DON és az F-2 ( $p=0,0069$ ;  $p < 0,05$ ) valamint, a DON és a T-2 toxinok ( $p=0,0051$ ;  $p < 0,05$ ) értékei igen. A mennyiségileg

meghatározható (>LOQ) koncentrációk értékelése a **4. táblázatban** látható, ahol az átlagot, SD, minimum és maximum értékeket adtuk meg.

A búza-, árpa- és kukoricaminták mérése előtt ötpon-tos kalibrációt végeztünk az általunk vizsgált *Fusarium* mikotoxinokra. A kalibrációs görbék korrelációs együtthatójának négyzete ( $R^2$ ) DON toxin kalibráció esetében: 0,9974, F-2 kalibrációnál: 0,9977, és T-2 kalibráció esetében: 0,9983 volt.

Búza esetében F-2 toxinra a minták vizsgálati eredményeinek 100 %-a volt LOQ feletti érték. Az árpánál a minták 20 %-ánál találtunk LOQ feletti DON-értékeket. Kukoricánál DON toxinra a minták 50 %-a; F-2, T-2 toxinokból a minták 20%-a tartalmazott a mérés alsó határa feletti értékeket (>LOQ). Az RStudio szoftver segítségével kiértékelt adatokat az **5. táblázatban** adtuk meg, ahol az összes vizsgált minta mikotoxin koncentrációinak statisztikai

értékelését látjuk. Itt is mindegyik mintában (hasonlóan az 1. csoporthoz) mind a három mikotoxin detektálható mennyiségben (>LOD) volt jelen.

Az általunk használt matematikai-statisztikai program az adatok gyors elemzését tette lehetővé. A kiértékelésből megállapíthatjuk, hogy a deoxinivalenol átlagértéke itt is egy nagyságrenddel nagyobb a zearalenon, és T-2 mikotoxinokénál.

A nagy eltérések miatt ebben az esetben sem volt értelme az eloszlás- és normalitásvizsgálatnak. Ha az eloszlás nem normális, a nem paraméteres Mann-Whitney U teszt használható: a háromféle mintacsoport esetében nincs szignifikáns különbség az egyes mikotoxinok mediánjai között (a  $p$  értékek minden esetben 0,05 fölöttiek voltak). A szintén robusztus Kruskal-Wallis ANOVA tesztet elvégezve azt tapasztaltuk, hogy ha minden mintacsoportot egyszerre vizsgálunk, akkor sincs szignifikáns különbség

4. táblázat. LOQ feletti mikotoxin-koncentrációk értékelése.  
Table 4. Evaluation of mycotoxin concentrations above the LOQ.

Mikotoxinok Mycotoxin	Minták Sample	>LOQ minták eloszlása >LOQ sample distribution (%)	Minták átlag- értéke Mean sample value ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	SD (szórás) SD (standard deviation) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Min. érték Min. value ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Max. érték Max. value ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
DON	Szója / Soy	0%	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>
	Lucerna pellet Alfalfa pellet	100%	<b>1164</b>	$\pm 143$	1050	1400
F-2	Szója / Soy	60%	<b>79</b>	$\pm 7$	72	85
	Lucerna pellet Alfalfa pellet	100%	<b>111</b>	$\pm 19$	86	134
T-2	Szója Soy	0%	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>
	Lucerna pellet Alfalfa pellet	100%	<b>74</b>	$\pm 7$	67	83

LOQ: A mennyiségi mérés alsó határa (Limit of quantification)

<sup>a</sup> Mennyiségi mérés alsó határa alatti mikotoxin-koncentrációk (<LOQ).

<sup>a</sup> Mycotoxin concentrations below the limit of quantification (<LOQ).

Min.: minimum

Max.: maximum

5. táblázat. Detektált mikotoxin koncentrációk (>LOD) értékelése az összes mintára vonatkoztatva  
(búza, árpa, kukorica), RStudio matematikai-statisztikai programmal.

Table 5. Evaluation of detected mycotoxin concentrations (>LOD) for all samples  
(wheat, barley, maize), using the RStudio mathematical-statistical program.

DON $\mu\text{g}/\text{kg}$	F-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	T-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Min.: 45.0	Min.: 17.00	Min.: 19.00
1st Qu.: 63.0	1st Qu.: 18.00	1st Qu.: 19.00
Medián / Median: 70.0	Medián / Median: 25.00	Medián / Median: 20.00
<b>Átlag / Mean: 145.0</b>	<b>Átlag / Mean: 39.00</b>	<b>Átlag / Mean: 24.00</b>
3rd Qu.: 271.0	3rd Qu.: 64.00	3rd Qu.: 23.00
Max.: 401.0	Max.: 72.00	Max.: 52.00

LOD: A detektálás alsó határa (Limit of detection)

1st Qu.: Első kvartilis (First quartile)

3rd Qu.: Harmadik kvartilis (Third quartile)

Min.: minimum

Max.: maximum

a mikotoxinok medián értékei között. Az F-2 mikotoxint vizsgálva a  $p$  érték a szignifikancia szint határán volt ( $p=0,0498$ ), külön-külön vizsgálva a csoportokat, nem szignifikáns a különbség a mediánok között. A mennyiségileg meghatározható koncentrációk kiértékelését a **6. táblázatban** foglaltuk össze, ahol az átlag, a szórás (SD), a minimum és a maximum értékeket adtuk meg. A DON esetében kukoricamintákban az átlagérték a szórással korrigálva ( $\pm$  SD)  $297 \pm 24 \mu\text{g}/\text{kg}$  volt.

A NÉBIH (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal) rendszeresen ellenőrzi hazánkban a takarmány-alapanyagok, takarmányok és az emberi élelmezésre szánt növényi alapanyagok különböző mikotoxin-szennyezettségét. Korábbi vizsgálatokból [22] származó eredmények szerint, 2003-ban DON toxinra  $n=222$  különböző mezőgazdasági alapanyagot vizsgáltak meg. Vizsgálatukból kiderült, hogy a minták 30,2%-a 0,040 mg/kg alatti koncentrációban, 10,4%-a 2,0 mg/kg feletti koncentrációban tartalmazta a toxint. 2008-ban ugyancsak DON toxinra végzett takarmány alapanyag vizsgálatuk során  $n=118$  mintát vizsgáltak, melynél 50%-a 0,040 mg/kg alatti, 6,8%-a 2,0 mg/kg feletti DON toxin szennyezettséget mutatott. A zearalenonra (F-2) vonatkozóan 2003-ban,  $n=128$  alapanyag mintát vizsgáltak meg, ebből 77,3%-a 0,010 mg/kg alatti koncentrációban tartalmazta a toxint, 0,8%-a 1,0 mg/kg feletti volt. 2008-ban F-2 toxinra vizsgált mintákban ( $n=56$ ) 0,010 mg/kg alatti eredmény 80,4%-ban fordult elő, de 1,0 mg/kg feletti mennyiséget nem találtak. T-2 toxin esetében 2003-ban,  $n=147$  mintát vizsgáltak, amelyekben kimutatási határ alatt a minták 94,6%-a volt, ez a szám 2006-ban 90%-os, 2008-ban ( $n=12$ ) már csak 75% volt. Ezek az eredmények is bizonyítják, hogy a mikotoxinok mennyisége évről évre változhat a különböző vizsgált mintákban az időjárási és klimatikus hatások eredményeképpen.

6. táblázat. LOQ feletti mikotoxin-koncentrációk értékelése.  
Table 6. Evaluation of mycotoxin concentrations above the LOQ.

Mikotoxinok Mycotoxin	Minták Sample	>LOQ minták eloszlása (%) >LOQ sample distribution (%)	Minták átlag- értéke Mean sample value ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	SD (szórás) SD (standard deviation) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Min. érték Min. value ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Max. érték Max. value ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
DON	Búza / Wheat	0%	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>
	Árpa / Barley	20%	<b>401</b>	n.é.	n.é.	n.é.
	Kukorica / Maize	50%	<b>297</b>	$\pm 24$	280	314
F-2	Búza / Wheat	100%	<b>69</b>	$\pm 4$	64	72
	Árpa / Barley	0%	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>
T-2	Kukorica / Maize	20%	<b>64</b>	n.é.	n.é.	n.é.
	Búza / Wheat	0%	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>
	Árpa / Barley	0%	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>
	Kukorica / Maize	20%	<b>52</b>	n.é.	n.é.	n.é.

LOQ: A mennyiségi mérés alsó határa (Limit of quantification)

<sup>a</sup> Mennyiségi mérés alsó határa alatti mikotoxin-koncentrációk (<LOQ).

n.é.: Nem értelmezhető, mivel egy minta volt LOQ felett.

Min.: minimum

Max.: maximum

2015-ben készült tanulmányunkban búza-, kukorica-, árpa- és zabmintákat vizsgáltunk ( $n=116$ ), a kukorica bizonyult szennyezettebb gabonának DON, F-2, T-2 toxinra vonatkozóan [17].

A mezőgazdasági alapanyagokban és az állati takarmányokban a *Fusarium* toxinok (DON, F-2, T-2) vizsgálata fontos feladat, hiszen e szennyezők innen kerülhetnek be a táplálékláncba.

## 5. Következtetések

A klímaváltozással kapcsolatban megjelenő új veszélyforrások egyike a mikotoxinok előfordulásának megnövekedett gyakorisága a táplálékláncban. Vizsgálatunk során a leggyakrabban használt takarmányozási alapanyagok DON, F-2, T-2 mikotoxin szennyezettségének mérését végeztük el kompetitív ELISA-módszerrel. A vizsgált három toxin minden egyes mintában detektálható (>LOD) volt. Az adatok alapján megállapítottuk, hogy a DON toxinok átlagértékei egy nagyságrenddel nagyobbak voltak, mint az F-2, és a T-2 mikotoxinok átlagértékei. Ezekből az adatokból az a következtetés vonható le, hogy az alapanyagokat legnagyobb mértékben szennyező toxin a DON, majd ezt követi az F-2, és végül a T-2 toxin.

Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a deoxinivalenol, F-2, T-2 mikotoxinok vizsgálata kiemelt jelentőségű feladat az élelmiszer- és takarmánybiztonság területén.

## 6. Irodalom

- [1] Kovács, F. (2010): Agrártermelés- Tápláléklánc- Mikotoxinok. Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Kovács, M. (szerk.). Agroinform Kiadó, Budapest. p. 7-11

- [2] Farkas, J., Beczner, J. (2009): A klímaváltozás és a globális felmelegedés várható hatása a mikológiai élelmiszer- biztonságra. *Klíma- 21 Füzetek*. 56. p. 4-5.
- [3] Bata, Á. (2001): Mikotoxinok meghatározásának analitikai módszerei. *Penészgombák – mikotoxinok a táplálékláncban*, Kovács, F. (szerk.). MTA, Agrártudományok Osztálya, Budapest. p. 20-29
- [4] Mesterházy, Á. (2015): Agrotechnikával a fuzárium megelőzésére. *Biokultúra*. 26(3). p. 30-32
- [5] Mesterházy, Á., Lehoczki-Krsjak, Sz., Varga, M., Tóth, B., Szabó-Hevér, Á., Bartók, T., Ács, K., Kótai, Cs. (2014) A búza kalászfuzáriumnak fejlesztése kalászfuzáriummal szemben. A kilencedik évtizedben, Matuz, J., Szilágyi, L.(szerk.). Szeged. p. 259-265
- [6] László, Gy. (2013): Biológiai növényvédelem Magyarországon. Engedélyezett növényvédő szerek az ökológiai és az integrált gazdaságban. *Biokultúra*. 24(2). [http://www.biokontroll.hu/cms/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1564:biologiai-noevenyvedelem-magyarorszagon&catid=112:novenytermesztes&Itemid=43](http://www.biokontroll.hu/cms/index.php?option=com_content&view=article&id=1564:biologiai-noevenyvedelem-magyarorszagon&catid=112:novenytermesztes&Itemid=43) Hozzáférés: 2016. 11. 04.
- [7] Mesterházy, Á., Tóth, B., Lehoczki-Krsjak, S., Szabó-Hevér, Á., Cseuz, L., Lemmens, M., Varga, M., Hertelendy, P. (2011): Breeding wheat with resistance to FHB: concepts, methods and results. In: Gilbert, J., Tekauz, A., Sweetland, N., Slusarenko, K. (eds.): Proc. of the 7th Canadian Workshop on Fusarium Head Blight., Winnipeg, Kanada. 122.
- [8] Szabó-Hevér, Á., Varga, M., Lehoczky-Krsjak, Sz., Lantos, Cs., Pauk, J., Purnhauser, L., Mesterházy, Á. (2013): Deoxinivalenol-tartalommal szembeni rezisztencia genetikai hátterének vizsgálata frontana eredetű térképező búzapopulációban. XIX. Növénynevelési Tudományos Nap. Pannon Egyetem Georgikon Kar. Keszthely
- [9] Kecskésné, N.E., Sembery, P. (2015): The effect of adequate technical conditions on level of Don toxin in milling process. *Annals of Faculty of Engineering Hunedoara - International Journal of Engineering*. 13(1). p. 49-52
- [10] Kecskésné, N.E., Korzenszky, P., Sembery, P. (2016/a): The role of color sorting machine in reducing food safety risks. *Potravinarstvo*. 10(1). p. 354-358
- [11] Kecskésné, N.E., Tima, H., Korzenszky, P., Sembery, P. (2016/b): Színválogatás után keletkezett malmi melléktermék DON-toxin-tartalmának vizsgálata takarmányként való felhasználás szempontjából. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 138(7). p. 421-430
- [12] Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. (1999): A review of worldwide con-

tamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *J. Anim F Sci and Techn*. 78. p. 21-37

- [13] Muller, H.M., Schwadorf, K. (1993): A survey of the natural occurrence of Fusarium toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany. *Mycopath*. 121. p. 115-121
- [14] Perkowski, J., Plattner, R.D., Golinski, P., Vesonder, R. F. (1990): Natural occurrence of deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, nivalenol, 4,7-di-deoxynivalenol and zearalenone in Polish wheat. *Mycotoxin Res*. 6. p. 7-12
- [15] Hietaniemi, V., Kumpulainen, J. (1991): Contents of Fusarium toxins in Finnish and imported grains and feeds. *Food Addit. Contam*. 8. p. 171-182
- [16] Campbell, A. D., Whitaker, T.B., Pohland, A. E., Divkens, J. W., Pork, D.L. (1986): Sampling, sample preparation and samplings plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. *Pure appl. Chem*. 58. p. 307-313
- [17] Tima, H., Brückner A., Mohácsi-Farkas, Cs., Kiskó, G. (2016): Fusarium mycotoxins in cereals harvested from Hungarian fields. *Food Add Cont Part:B*. 9(2). p. 127-131
- [18] Bata, Á., Harrach, B., Ujszászi, K., Kis-Tamás, A., Lásztity, R. (1985): Macrocylic trichotecene toxins produced by stachybotrys atra strains isolated in Middle Europe. *Appl. Environm. Microbiol*. 49. p. 679-681
- [19] Pohland, A.E., Thorpe, C.W., Trucksess, M.W., Eppley, R.M. (Eds.) (1986): *Diagnosis of Mycotoxicoses*. Martinus Nijhoff. The Hague. 271
- [20] Barna-Vetró, I., Gyöngyösi, Á., Solti, L. (1994): Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for Fusarium, T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl. Environm. Microbiol*. 60. p. 730-731
- [21] Barna-Vetró, I., Solti, L. (2001): Mikotoxinok mérésére alkalmas enzim-immunanaltikai módszerek. *Penészgombák – mikotoxinok a táplálékláncban*, Kovács, F. (szerk.). MTA, Agrártudományok Osztálya, Budapest. p. 30-41
- [22] Búza, L., Marthné, S.J. (2010): Mikotoxinok vizsgálati módszerei, eredményei, előfordulásuk a hazai takarmányokban. *Aktualitások a mikotoxin kutatásban*, Kovács, M. (szerk.). Agroinform Kiadó, Budapest. p. 13-19
- [23] Farkas, J., Szeitzné Sz.M., Mohácsi F.Cs. (2014): Mikotoxinok álarcban- új takarmány- és élelmiszer-biztonsági kihívás? *Élviszsg. Köz*. 3.
- [24] Ihaka, R., Gentleman, R. (1996): A language for data analysis and graphics. *J. Computat. and Graph. Stat*. 5(3). p. 299-314

# TARTSON LÉPÉST AZ ÉLELMISZER-BIZTONSÁG EGYRE SOKASODÓ KIHÍVÁSAIVAL!

Rendelje meg, és olvassa rendszeresen az **Élelmiszervizsgálóati Közleményeket!**



- Kizárólag tudományos cikkekkel, kétnyelvű formában és megújult külsővel jelentkezik negyedévente a több mint 60 éves múltra visszatekintő folyóirat
- Előfizetőink a [www.eviko.hu](http://www.eviko.hu) oldalról is letölthetik a kéziratokat teljes terjedelmükben

**Csatlakozzon Ön is az olvasótáborunkhoz, amelynek tagjai vizsgálólaboratóriumok, élelmiszer-előállítók, -forgalmazók, hatósági szervezetek, kutatóintézetek, egyetemek munkatársai.**



Helga Tima<sup>1</sup>, Eleonóra Kecskésné Nagy<sup>2</sup>, Anita Rácz<sup>3</sup>, Gabriella Kiskó<sup>1</sup>  
Csilla Mohácsiné Farkas<sup>1</sup>

Received: 2016. November – Accepted: 2017. May

## DON, F-2 and T-2 mycotoxin assay of plant-based feedstock raw materials using the ELISA method

**Keywords:** feedstock, ELISA, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 mycotoxin

### 1. Summary

In our study, plant-based raw materials, used for feeding different animal species, are investigated, using a competitive ELISA method. The raw materials most commonly used for feeding (soy and alfalfa pellets, as well as wheat, barley and maize) were used in the tests. Of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol (DON), zearalenone (F-2) and T-2 toxins were measured. Measurement results were evaluated using the mathematical-statistical program RStudio. In our experiment, we found that all three mycotoxins tested could be detected in all of the samples, but the values were not quantifiable with acceptable precision in each case. The average detected DON toxin result was an order of magnitude greater than the results of the other toxins. It has been shown in our study that the presence of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone and T-2 poses a serious food and feed safety risk, since they are present in feedstock raw materials, even though only in small amounts. Today, these mycotoxins are present together in more and more cases, greatly increasing the above-mentioned risk.

### 2. Introduction

Contaminants of natural origin include mycotoxins, produced by microscopic fungi, which are secondary metabolic products of molds. The human and animal health significance of mycotoxins are outstanding [1]. Because of the climate change currently taking place, the risk of toxin occurrence on the food chain is of great importance. Based on the resolutions of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) of the UN and the World Meteorological Organization (WMO), the research program named VAHAVA (Változás-Hatás-Válaszadás, Change-Effect-Response), and the National Climate Change Strategy adopted by the Parliament: „increased effects of climate change are expected in the Carpathian Basin” [2]. This process can affect adversely the domestic agriculture due to the expected loss in yields, may have a negative effect on food and feed safety because of the proliferation of harmful microorganisms, and can also have an indirect effect on human

and animal health. Global climate change can promote the growth of mycotoxin-producing molds [2]. Animals fed on feeds contaminated with mycotoxins pose a serious food safety risk, so the consumption of products made from them may be risky as well, the development and weight gain of animals feeding on feeds containing toxins slows down, and their reproduction and animal health conditions deteriorate also. Adverse animal health characteristics affect livestock production, and so economic efficiency and production indicators can also decrease [3].

In the last decade, interest has been focused more and more on mycotoxin research. Many experiments have been carried out in order to be able to reduce the risk of mycotoxins entering the food chain. There are also studies aimed at reducing the amounts of the contaminants that are within expected or allowed limit values (for example, in the case of raw materials) to even lower levels. The risk of toxins entering the food chain can be minimized by preventive

agrotechnical operations applied during the growing of cereals [4]. Of these, the most widely used chemical plant protection can be highlighted, the efficiency and efficacy were investigated by Mesterházy et al. [5]. Also worth mentioning is biological plant protection, offering wider and wider possibilities, with the application of which pathogens can be suppressed by their natural enemies [6]. An important factor in preventive defense is variety selection, and in this respect, a pronounced role is played by plant breeding, i.e., the production of resistant or tolerant grain varieties [7], [8].

The efficiency and efficacy of preventive agrotechnical operations depend greatly on the vintage effect and the technological discipline, as demonstrated by the experiences of recent years. In years with conditions favorable for the proliferation of *Fusarium* fungus, we should be prepared that wheat lots contaminated by the toxins to varying degrees will be harvested. In such years, there is also an increased risk that feeds will be more contaminated by the toxins than food industry raw materials. The main reason for this is that, in food production, raw materials must be selected in compliance with very strict legal regulations. Cereal lots that do not satisfy these criteria, for example, because of their toxin contamination, may be qualified as feeds. In view of this, a prominent role is played by research aimed at reducing toxin concentrations in the post-harvest period. In animal feeding one of the possibilities is the addition to feeds of such substances that can absorb toxins that are harmful to the animals. Bata [3] reports that toxin feeding experiments are performed on pigs, cattle, laying hens and turkeys of different age groups, and changes in their health status are monitored. Experiments have shown that fusariotoxicosis is manifested in mixed symptoms, and that the species most sensitive to fusariotoxins are pigs and poultry. In the case of these species, reproductive disorders and secondary diseases, the weakening of the immune system, are caused by them. Cattle are less sensitive to these toxins than pigs.

In the post-harvest period, it is possible to reduce the toxin content by cleaning grain using modern equipment. The efficiency of color sorting and surface cleaning is primarily investigated in the case of food raw materials [9], [10], but it is also possible to use these methods during the preparation of materials used for feeding, if justified. It was pointed out by Kecskésné et al. [11] that the DON toxin content of the so-called byproduct, the fraction that is produced in addition to milling wheat during the color sorting, before grinding, of wheat intended for milling, increased in all cases, compared to the toxin content of the starting, unpurified wheat lot. However, the extent of the increase does not correlate with either the toxin content of the starting material, or the efficiency of the purification, because it can also be influenced by other factors that can be hard to determine in advance. It is important to know this, because the

above-mentioned byproduct is used as feed or as an ingredient in feed mixtures. According to the experimental results, it is definitely recommended to measure the toxin content of such byproducts before use, to avoid the toxin contamination of feeds.

Humans, at the top of the food chain, can rightfully expect that the product reaching their table meet their health maintenance and disease prevention needs. Maintaining food safety, i.e., the detection of unsafe products and their removal from commercial circulation, is a major task.

The contamination of feeds and feed raw materials (primarily cereals) caused by DON, F-2 and T-2 mycotoxins has been a serious food safety challenge all over the world, and it still is [12]. In Germany, according to a previous study on wheat samples ( $n=84$ ), DON mycotoxin values ranged from 4.0 to 20500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , F-2 toxin values were between 1.0 and 8040  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , while T-2 could be detected in amounts between 3.0 and 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [13]. In Poland in 1990, when investigating wheat samples as well, the DON toxin contamination was between 2000 and 40000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , while the amount of zearalenone toxin was lower, in the range of 10 to 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [14]. In the case of maize, also in Poland, only deoxynivalenol toxin was tested, and the samples proved to be more contaminated than wheat samples. Values ranged from 4.0 to 320  $\text{mg}/\text{kg}$  [12]. In Finland, the DON contamination of animal feeds and cereals (maize, wheat, barley) was between 7.0 and 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , while F-2 toxin values ranged from 22.0 to 95.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [15], which were considerably lower than the above data. Data show that toxin concentrations may vary widely in a given area and period. Accordingly, food safety conditions can only be met reliably, if a toxin level monitoring system for feed raw materials is developed and toxin levels are continuously measured within its framework.

The contamination of feeds with molds does not always indicate the presence of mycotoxins as well [16], [17]. To judge the mycotoxin contamination accurately, sufficiently sensitive and specific analytical methods are needed. Generally speaking, detection of any of the mycotoxins is a very complex, time-consuming and costly process, the accuracy of which depends greatly on the correctness and efficiency of sampling [16]. Methods of determination were initially based on thin layer chromatography, and later on gas and liquid chromatography [18], [19]. These were supplemented by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) methods [19]. In addition to these high performance analytical methods, routine immunoassays were also developed for the qualitative and quantitative determination of certain mycotoxins [20], [21].

In recent years, the emergence of ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) methods and high performance liquid chromatography methods with fluorescence or mass spectrometric detection could be

<sup>1</sup> Szent István University, Faculty of Food Science, Department of Microbiology and Biotechnology

<sup>2</sup> Pallasz Athéné University, Faculty of Horticulture and Rural Development

<sup>3</sup> Szent István University, Faculty of Food Science, Department of Applied Chemistry

observed [22]. Currently used analytical methods are classified into three major categories: fast methods, separation techniques, immunological procedures.

However, the detection of mycotoxins has recently recognized limitations, primarily in the case of masked and bound toxins. The difficulties of masked mycotoxin determination come from their altered physicochemical properties, resulting in a changed extractability. Therefore, when using the usual analytical methods, their quantification is uncertain, and that of bound toxins is impossible [23].

### 3. Materials and methods

#### 3.1. Materials

For our investigations, feed raw materials were divided into two groups. In the first test group, a total of 20 samples soybean ( $n=10$ ) and alfalfa ( $n=10$ ) pellets made of green plant parts. Also 20 were included in the second test group. Here, the toxin contents of the grains of cereals, namely wheat ( $n=10$ ), barley ( $n=5$ ) and maize ( $n=5$ ) were measured. So our total number of samples was  $n=40$ . Fast informative mycotoxin assay of the feed raw materials was performed by a competitive ELISA method, using Ridascreen Fast kits (R-Biopharm). The “souls” of the fast tests used by us were the standard solutions, contained by the kits according to the specific toxin measurement. DON kit (RIDASCREEN® FAST DON, Art. No.: R5902, 48 wells) standard solutions: „blank solution containing no mycotoxin”, 0.222 mg/kg, 0.666 mg/kg, 2 mg/kg, 6 mg/kg. Zearalenon kit (RIDASCREEN® FAST ZEARELENON, Art. No.: R5502, 48 wells) standard solutions: „blank solution containing no mycotoxin”, 50 µg/kg, 100 µg/kg, 200 µg/kg, 400 µg/kg. T-2 kit (RIDASCREEN® FAST T-2, Art. No.: R5302, 48 wells) standard solutions: „blank solution containing no mycotoxin”, 50 µg/kg, 100 µg/kg, 200 µg/kg, 400 µg/kg. For the measurement, a Metertech-500 spectrophotometer (ELISA Reader) was used, with a measurement wavelength of 450 nm. Standard solutions necessary for method validation were from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Németország). Results were evaluated using the special software RIDA® SOFT WIN (Art. No.: Z9999). Statistical analysis was performed by the RStudio (Version 0.98.953) program.

#### 3.2. Sample preparation

Samples were air-dry, so no further drying was necessary. Test samples were homogenized using a 1.0 mm mill crush size (Tecator, Sweden). Sample preparation for mycotoxins DON, F-2 and T-2 were performed according to the manufacturer’s instructions (R-Biopharm). In the case of DON mycotoxin, 5 grams of the sample (ground, mixed) was weighed into a lockable glass crucible, then the solution was shaken intensely with 100 ml of distilled water for 30 minutes on a shaker (Tecator). The mixture was filtered into a

100 ml Erlenmeyer flask through a Whatman 1 filter placed in a glass funnel. 50 µl of the filtrate was used for the test: RIDASCREEN® FAST DON.

In the case of mycotoxins F-2 and T-2, the sample preparation protocols were the same, that is, aliquots of the same working solution were used for the tests. 5 grams of the sample was weighed, transferred into a 100 ml flask, 25 ml of 70% MeOH was added, and then it was shaken intensely for 30 minutes on a shaker. The mixture was filtered into a 100 ml Erlenmeyer flask through a Whatman 1 filter placed in a glass funnel. To 1 ml of the filtrate, 1 ml of distilled water was added, and 50 µl of the diluted sample was used for the tests: RIDASCREEN® FAST ZEARELENON, RIDASCREEN® FAST T-2.

#### 3.3. Method validation

Suitability of the kits for the quantitative analysis of mycotoxins have been verified by the certificates of several relevant organizations: the AOAC, Association of Official Chemists (AOAC International/Research Institute – PTM/Performance Tested Methods), the FGIS (Federal Grain Inspection Services - program of the Grain Inspection), and the USDA/GIPSA (Packers and Stockyards Administration of the United States Department of Agriculture).

Validation of the DON toxin measurement method has been performed for the cereals and other plant-based raw materials listed by the manufacturer in the certificate, such as maize, wheat, barley, malt, wheat bran, sorghum, wheat flakes, wheat flour, soy flour, soy flakes, alfalfa, as well as cereal-based feeds. The limit of detection (LOD) specified by the manufacturer was 0.15 mg/kg, the limit of quantification (LOQ) was 0.20 mg/kg. Validation of the F-2 toxin measurement method was performed for cereals, such as maize, wheat, barley, oats, as well as mixed feeds. The detection range specified by the manufacturer was 17 to 41 µg/kg, the LOQ was 50 µg/kg. Validation of the T-2 toxin measurement method was performed for maize, pig and poultry feeds, as well as mixed feeds. The limits specified by the manufacturer were as follows: LOD: 20 µg/kg, LOQ: 50 µg/kg. Detection limits and limits of quantification, as specified by the certificates enclosed with the kits are summarized in **Table 1**.

We also performed the validation of the measurement methods, during which  $n=10$  wheat samples (blank) were used for the determination of each mycotoxin limit of detection (LOD), according to the sample preparation and measurement specified by the manufacturer. This was necessary, because concentration results exceeding the LOD were used during the evaluation and data analysis. LOD calculations were performed using the average concentration values calculated with the help of the calibration curves, based on the absorbance of the samples tested, and the corresponding standard deviation (SD) values.

$LOD = (\text{average of blank calculated concentration}) + (\text{twice the measurement results /SD/ standard deviation})$

Recovery percentage determinations were performed at three different concentration levels (50, 100, 200 µg/kg). To the control wheat samples, 500 µg/l of the mycotoxin standard working solution, prepared by us, was added to set the estimated three concentration levels. For each concentration, six parallels were used each day.

$Recovery \% = 100 \times \text{measured content} / \text{adjusted level}$

To determine the intermediate precision or correctness, the same steps were repeated two more times. Each mycotoxin was measured 3 times at all concentration levels. Analyses were completed within two months, involving two different analysts, in the same laboratory, using the same instruments. Precision is value characteristic of the random changes of the measurement, which can be described by the within-laboratory variability, among other things.

$H = X_{meas} - X_{ref}$

Where  $H$  is the precision, equal to the difference between the measured ( $X_{meas}$ ) and the reference value ( $X_{ref}$ ), if a certified reference material (CRM) is available. In the absence of a CRM, the  $X_{ref}$  value was determined by us.

Wheat samples were used for the determination of the validation parameters of each mycotoxin tested (DON, F-2, T-2). Results are summarized in **Table 2**.

Results were as follows: LOD for DON mycotoxin was 13 µg/kg, for toxin F-2 it was 17 µg/kg, and in the case of T-2 it was 12 µg/kg. Recovery ranged from 85.3 to 98.1%, and the coefficient of variation (CV) was 3.4- 5.7%. Intermediate precision was 86.9-96.9%, CV: 5.9- 7.1%. Calculations of the concentration values obtained in our analyses were based on the recovery of the given mycotoxin average value. According to the recovery acceptance criteria, the values should be between 60 and 115% in the case of a concentration value of 0.01 mg/kg, and between 80 and 110% in the case of 0.1 mg/kg (they have to comply with the provisions of Sections 1 and 2 of Annex III of Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and the Council). In our case, recovery was acceptable. However, in the case of the T-2 kit, cross-reactivity of toxin HT-2 has to be taken into consideration, and the cross-reaction specified by the manufacturer has to be taken into account. Test procedures and steps were carried out according to the instructions supplied by the manufacturer or the distributor (R-Biopharm, D.G.).

### 4. Results and evaluation

Prior to the mycotoxin analyses, a five-point standard calibration was performed, using the standard solutions supplied with the tests. The correlation co-

efficient ( $R^2$ ) of the calibration curve in the case of DON toxin calibration was 0.9962; in the case of F-2 calibration it was 0.9998, and in the case of T-2 calibration it was 0.9943. The calibration is linear, if the correlation coefficient ( $R^2$ ) is greater than 0.990. In the case of soy, for DON and T-2 toxins, test results of all of the samples were below the limit of quantification (<LOQ), but the toxins could be detected (>LOD). F-2 toxin could be quantified (>LOQ) in 60% of soy samples. In the case of the alfalfa pellet samples, concentrations were above the LOQ in 100% of the samples for all three toxins. Data evaluated with the help of the RStudio software (RStudio Inc.) [24] can be seen in **Table 3**. This table shows the statistical evaluation of the mycotoxin concentrations of all of the samples tested, indicating that the median and mean values of DON mycotoxins are an order of magnitude higher than those of the zearalenone and T-2 mycotoxins, which were above the limit of detection in all cases (>LOD).

Due to the low sample number and the large difference between the median values for DON and the other two mycotoxins, analysis of the distributions and the normality cannot be performed, because of the high uncertainty. If a normal distribution cannot be demonstrated, then the median values can be compared using the Wilcoxon test. For the samples tested, median values of the F-2 and T-2 mycotoxins do not differ from each other significantly ( $p=0.0926$ ;  $p>0.05$ ), but the values of the DON and F-2 ( $p=0.0069$ ;  $p<0.05$ ), and DON and T-2 toxins ( $p=0.0051$ ;  $p<0.05$ ) do. Evaluation of the quantifiable (>LOQ) concentrations is shown in **Table 4**, where the average, SD, minimum and maximum values are given.

Before the measurement of wheat, barley and maize samples, a five-point calibration was performed for the Fusarium mycotoxins analyzed by us. The squares of the correlation coefficient ( $R^2$ ) of the calibration curves for DON toxin calibration, F-2 calibration and T-2 calibration were 0.9974, 0.9977 and 0.9983, respectively.

In the case of wheat, 100% of the test results of the samples exceeded the LOQ value for F-2 toxin. For barley, DON values were above the LOQ in 20% of the samples. For maize, values were above the limit of quantification (>LOQ) in 50% of the samples for DON toxin, and in 20% of the samples for toxins F-2 and T-2. Data evaluated with the help of the RStudio software are given in **Table 5**, where the statistical evaluation of the mycotoxin concentrations of all of the samples tested can be seen. Here again, similarly to group 1, all three mycotoxins were present in detectable (>LOD) amounts.

The mathematical-statistical program used by us made quick analysis of the data possible. It can be concluded from the evaluation that the mean value of deoxynivalenol is an order of magnitude higher than those of zearalenone and T-2 mycotoxins here again.

Due to the large differences, there was no point in this case either to perform distribution and normality analyses. If the distribution is not normal, the non-parametric Mann-Whitney U test can be used: there is no significant difference between the median values of the individual mycotoxins for the three sample groups ( $p$  values were above 0.05 in all cases). Performing the also robust Kruskal-Wallis ANOVA test, we found that even if all sample groups are examined together, there is still no significant difference between the median values of the mycotoxins. When examining the F-2 mycotoxin, the  $p$  value was bordering on the significance level ( $p=0.0498$ ), and when examining the groups separately, there was no significant difference between the medians. Evaluation of the quantifiable concentrations is summarized in **Table 6**, where the mean, standard deviation (SD), minimum and maximum values are given. In the case of DON, in maize samples, the mean value corrected by the standard deviation ( $\pm$  SD) was  $297 \pm 24 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

In Hungary, the mycotoxin contamination of feed raw materials, feeds and plant raw materials intended for human consumption is regularly checked by the National Food Chain Safety Office (NÉBIH). Based on results from previous studies [22], in 2003,  $n=222$  different agricultural raw materials were tested for DON toxin. The study shows that 30.3% of the samples contained the toxin in concentrations below 0.040 mg/kg, while 10.4% of them contained it in concentrations above 2.0. In 2008, in another study for DON toxin in feed raw materials,  $n=118$  samples were analyzed, 50% of which showed a DON toxin contamination below 0.040 mg/kg, while 6.8% of them had DON concentrations above 2.0 mg/kg. In 2003,  $n=128$  raw materials were tested for zearalenone (F-2), 77.3% of which contained the toxin in concentrations below 0.010 mg/kg, while concentrations were above 1.0 mg/kg in 0.8%. In 2008, during the same analysis for F-2 toxin ( $n=56$ ), concentrations below 0.010 mg/kg occurred in 80.4% of the cases, while no sample with a concentration above 1.0 mg/kg was found. In the case of T-2 toxin in 2003,  $n=147$  samples were tested, 94.6% of which had concentrations below the limit of detection, while the number was 90% in 2006, and only 75% in 2008 ( $n=12$ ). These results demonstrate that the amounts of mycotoxins in the different samples tested can change from year to year, as a result of the weather and climatic effects.

In our 2015 study, wheat, maize, barley and oat samples ( $n=116$ ) were analyzed, and for DON, F-2 and T-2 toxins, maize proved to be the most contaminated cereal [17].

The analysis of Fusarium toxins (DON, F-2, T-2) in agricultural raw materials and animal feeds is an important task, because that is where these contaminants can enter the food chain from.

## 5. Conclusions

One of the new threats emerging in connection with climate change is the increased frequency of mycotoxin occurrence in the food chain. In our study, the DON, F-2 and T-2 mycotoxin contamination of the most commonly used feed raw materials was measured using a competitive ELISA method. The three toxins tested could be detected in all of the samples ( $>LOD$ ). Based on the data, it was found that the mean values for the DON toxin were an order of magnitude higher than the mean values of the F-2 and T-2 mycotoxins. From these data, the conclusion can be drawn that the toxin contaminating raw materials the most is DON, followed by F-2, and then toxin T-2.

Our results draw attention to the fact that the analysis of the mycotoxins deoxynivalenol, F-2 and T-2 is of the utmost importance in the fields of food and feed safety.

## 8. References

- [1] Kovács, F. (2010): Agrártermelés- Tápláléklánc- Mikotoxinok. Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Kovács, M. (szerk.). Agroinform Kiadó, Budapest. p. 7-11
- [2] Farkas, J., Beczner, J. (2009): A klímaváltozás és a globális felmelegedés várható hatása a mikológiai élelmiszer- biztonságra. Klíma- 21 Füzetek. 56. p. 4-5.
- [3] Bata, Á. (2001): Mikotoxinok meghatározásának analitikai módszerei. Penészgombák – mikotoxinok a táplálékláncban, Kovács, F. (szerk.). MTA, Agrártudományok Osztálya, Budapest. p. 20-29
- [4] Mesterházy, Á. (2015): Agrotechnikával a fuzárium megelőzésére. Biokultúra. 26(3). p. 30-32
- [5] Mesterházy, Á., Lehoczki-Krsjak, Sz., Varga, M., Tóth, B., Szabó-Hevér, Á., Bartók, T., Ács, K., Kótai, Cs. (2014) A búza kalászfuzáriumának fejlesztése kalászfuzáriummal szemben. A kilencedik évtizedben, Matuz, J., Szilágyi, L. (szerk.). Szeged. p. 259-265
- [6] László, Gy. (2013): Biológiai növényvédelem Magyarországon. Engedélyezett növényvédő szerek az ökológiai és az integrált gazdaságban. Biokultúra. 24(2). [http://www.biokontroll.hu/cms/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1564:biologiai-noevenyvedelem-magyarorszagon&catid=112:novenytermesztas&Itemid=43](http://www.biokontroll.hu/cms/index.php?option=com_content&view=article&id=1564:biologiai-noevenyvedelem-magyarorszagon&catid=112:novenytermesztas&Itemid=43) Acquired: 11. 04. 2016.
- [7] Mesterházy, Á., Tóth, B., Lehoczki-Krsjak, S., Szabó-Hevér, Á., Cseuz, L., Lemmens, M., Varga, M., Hertelendy, P. (2011): Breeding wheat with resistance to FHB: concepts, methods and results. In: Gilbert, J., Tekauz, A., Sweetland, N., Slusarenko, K. (eds.): Proc. of the 7th Canadian Workshop on Fusarium Head Blight, Winnipeg, Kanada. 122.

- [8] Szabó-Hevér, Á., Varga, M., Lehoczki-Krsjak, Sz., Lantos, Cs., Pauk, J., Purnhauser, L., Mesterházy, Á. (2013): Deoxynivalenol-tartalommal szembeni rezisztencia genetikai hátterének vizsgálata frontana eredetű térképező búz populációban. XIX. Növénynevelési Tudományos Nap. Pannon Egyetem Georgikon Kar. Keszthely
- [9] Kecskésné, N.E., Sembery, P. (2015): The effect of adequate technical conditions on level of Don toxin in milling process. Annals of Faculty of Engineering Hunedoara - International Journal of Engineering. 13(1). p. 49-52
- [10] Kecskésné, N.E., Korzenszky, P., Sembery, P. (2016/a): The role of color sorting machine in reducing food safety risks. Potravinarstvo. 10(1). p. 354-358
- [11] Kecskésné, N.E., Tima, H., Korzenszky, P., Sembery, P. (2016/b): Színválogatás után keletkezett malmi melléktermék DON-toxin-tartalmának vizsgálata takarmányként való felhasználás szempontjából. Magyar Állatorvosok Lapja. 138(7). p. 421-430
- [12] Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. (1999): A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. J. Anim F Sci and Techn. 78. p. 21-37
- [13] Muller, H.M., Schwadorf, K. (1993): A survey of the natural occurrence of Fusarium toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany. Mycopath. 121. p. 115-121
- [14] Perkowski, J., Plattner, R.D., Golinski, P., Vesonder, R. F. (1990): Natural occurrence of deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, nivalenol, 4,7-di-deoxynivalenol and zearalenone in Polish wheat. Mycotoxin Res. 6. p. 7-12
- [15] Hietaniemi, V., Kumpulainen, J. (1991): Contents of Fusarium toxins in Finnish and imported grains and feeds. Food Addit. Contam. 8. p. 171-182
- [16] Campbell, A. D., Whitaker, T.B., Pohland, A. E., Divkens, J. W., Pork, D.L. (1986): Sampling, sample preparation and samplings plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. Pure appl. Chem. 58. p. 307-313
- [17] Tima, H., Brückner A., Mohácsi-Farkas, Cs., Kiskó, G. (2016): Fusarium mycotoxins in cereals harvested from Hungarian fields. Food Add Cont Part:B. 9(2). p. 127-131
- [18] Bata, Á., Harrach, B., Ujszászi, K., Kis-Tamás, A., Lásztity, R. (1985): Macrocyclic trichotecene toxins produced by stachybotrys atra strains isolated in Middle Europe. Appl. Environm. Microbiol. 49. p. 679-681
- [19] Pohland, A.E., Thorpe, C.W., Trucksess, M.W., Eppley, R.M. (Eds.) (1986): Diagnosis of Mycotoxicoses. Martinus Nijhoff. The Hague. 271
- [20] Barna-Vetró, I., Gyöngyösi, Á., Solti, L. (1994): Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for Fusarium, T-2 and zearalenone toxins in cereals. Appl. Environm. Microbiol. 60. p. 730-731
- [21] Barna-Vetró, I., Solti, L. (2001): Mikotoxinok mérésére alkalmas enzim- immunanalitikai módszerek. Penészgombák – mikotoxinok a táplálékláncban, Kovács, F. (szerk.). MTA, Agrártudományok Osztálya, Budapest. p. 30-41
- [22] Búza, L., Marthné, S.J. (2010): Mikotoxinok vizsgálati módszerei, eredményei, előfordulásuk a hazai takarmányokban. Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Kovács, M. (szerk.). Agroinform Kiadó, Budapest. p. 13-19
- [23] Farkas, J., Szeitzné Sz.M., Mohácsi F.Cs. (2014): Mikotoxinok álarcban- új takarmány- és élelmiszer-biztonsági kihívás? Élvizsg. Köz. 3.
- [24] Ihaka, R., Gentleman, R. (1996): A language for data analysis and graphics. J. Computat. and Graph. Stat. 5(3). p. 299-314