

Bazı Fungal Metabolitlerin Biyolojik Ölçüm Metoduyla Belirlenmesi

Metin DIĞRAK
KSÜ. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş

Zeynep ULUKANLI
KÜ. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü, Kars

Özet

Bu çalışmada Kahramanmaraş piyasasında satışı sunulan bazı sebze ve meyvelerden izole edilen ve identifikasyonları yapılan *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Fusarium equiseti* ve *Penicillium italicum* türlerinin modifiye Czapek-Dox buyyonda (mCDB) toksin oluşumu biyolojik ölçüm metoduyla belirlenmiştir. Ayrıca oluşan total biyokütle miktarı da tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, çalışmada kullanılan türlerin oluşturduğu toksinler *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus brevis* FMC 3, *Proteus vulgaris* FMC 1, *Escherichia coli* DM ve *Enterobacter aerogenes* CCM 2531'in gelişmelerini inhibe etmiştir. Sonuçlar biyolojik ölçüm metodunun, toksin standartları ve kromatografik çalışma imkanı bulunmayan durumlarda kullanılabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik ölçüm metodu, Fungus, Mikotoksin

Determination of Some Fungal Metabolites by Bioassay Method

Abstract

In this study, the toxin occurrence of *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Fusarium equisetum* and *Penicillium italicum* isolated from some vegetables and fruits and identified in modified Czapek-Dox Broth (mCDB) was determined by bioassay method. Moreover the produced total biomass amount was also investigated. At the end of this investigation, toxins produced by the species used in the study inhibited the developments of *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus brevis* FMC 3, *Proteus vulgaris* FMC 1 and *Enterobacter aerogenes* CCM 2531. The findings indicated that the bioassay method could be used in the case of absence of toxin standards and chromatographic possibilities.

Key Words: Bioassay methods, Fungi, Mycotoxin

Giriş

Beslenmemizde yararlanılan bitkisel ve hayvansal orijinli gıda maddeleri bazı hallerde insan sağlığını olumsuz yönlere etkileyebilmektedir. Bu olumsuz etki, tarım ilaçları kalıntısı bulunduran bitkisel ürünlerle, çeşitli nedenlerle bozulmuş bitkisel ve hayvansal gıda maddelerinin tüketilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Tarımsal ürünlerde, yetiştirmeye başladıkları andan tüketilinceye kadar geçen zaman içerisinde, bünye ve ortam şartlarına bağlı olarak gelişen mikroorganizmalar ve bunlar arasında özellikle küfler bazı toksik maddeler meydana getirmektedirler.

Genellikle küf mantarlarının metabolik ürünü olan bu toksik maddeler “Mikotoksin” adını almaktadır. Kabuklu tohumlar üzerinde yapılan çalışmalarda aflatoxin B₁, B₂, G₁ ve G₂ sitrinin, ostaroksin, patulin, sterigmatosistin, diasetoksiskirpenol, T-2 toksin ve zeralonen varlığı belirlenmiştir (Abdel-Gawad ve Zohri, 1993). Toksin meydana getirmeyen bir kısım küfler ise üredikleri yerde çeşitli zarar ve bozulmalara neden olabilmektedir.

Gıda maddeleri üzerinde üreyen küf mantarları çok çeşitli olup, mikotoksin yapma yeteneğinde olanlar genellikle *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* (Abdel-Gawad ve Zohri, 1993) ilave olarak *Rhizopus* ve *Eurotium* (Zohri ve Abdel-Gawad, 1993) cinslerine ait olan türlerdir. Meyve, sebze ve tahıllarda bozulmalara neden olan *Alternaria* türleri çeşitli mikotoksinler de oluşturmaktadır. Bunlardan benzopiron yapısında alternariol, alternariol metil ester ve altenüen; perilen yapısında albertoksin I ve II ve tetramik asit türevi yapısında tenuazonik asittir (Logrieco ve ark., 1990). Bu toksinler, bir çok *Alternaria* türü tarafından oluşturulmakta ve sinerjik toksin etkisi göstermektedir.

Yapılan bazı araştırmalarda *Alternaria* toksinlerinin mutajen olduğu (Pero ve ark., 1973; Stinson ve ark., 1981), bronşial astım, pnömoni ve mikotik infeksiyonlarda *Alternaria* türlerinin etkili olduğu tespit edilmiştir (Rovira ve ark., 1990). Funguslarla kontamine olan özellikle mikotoksin içeren gıda maddeleri ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Abdel-Gawad ve Zohri, 1993; Zohri ve Abdel-Gawad, 1993; Purwoko ve ark., 1991). Mikotoksinlerin ölçülmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik ölçüm yöntemi ile standartların olmadığı durumlarda kalitatif olarak mikotoksinlerin varlığını tespit etmek mümkündür (Purwoko ve ark., 1991). Yapılan çeşitli araştırmalarda *Bacillus megaterium*'un aflatoxin, patulin ve *Alternaria* toksinlerine karşı duyarlı olduğu belirtilmektedir (Buckle ve Sanders, 1985; Özçelik, 1985).

Yapılan bu çalışmada, Kahramanmaraş hal, pazaryeri ve evlerden temin edilen hastalıklı sebze ve meyvelerden izole edilen ve teşhisleri yapılan bazı mantar türlerinin oluşturduğu mikotoksinlerin biyolojik yolla ölçülmesi denenecektir. Böylece, toksin standartlarının olmadığı ve kromatografik çalışma imkanı bulunmayan yerlerde belirtilen metodun kullanılabilirliği belirlenecek ve daha sonra yapılacak olan çalışmalara veri sağlanacaktır.

Materyal ve Metot

Test Bakterileri

Test bakterileri olarak kullanılan *Bacillus subtilis* IMG 22, (Institute of Microbiology Rutgers-The State University New Brunswick N.J., Amerika 08903), *Bacillus megaterium* DSM 32 (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen, Grisebachstrasse 8. 0-3400 Göttingen, Germany), *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Proteus vulgaris* FMC 1, *Escherichia coli* DM, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Bacillus brevis* FMC 3, *Listeria monocytogenes* A, *Staphylococcus aureus* Cowan 1, *Mycobacterium smegmatis* RUT türleri ise Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu araştırmada yapılan çalışmalar üç paralel olarak yürütülmüş ve sonuçlar ortalama olarak verilmiştir.

Örneklerin Alınması ve Küf Mantarlarının İzolasyonu

Çalışmada Hal, Pazaryeri ve evlerde doğal olarak küflenmiş *Lycopersicum esculentum* Miller (Domates), *Capsicum annum* L. (Biber), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Portakal), *Citrus limon* L (Limon), *Raphanus raphanistrum* L. (Turp), *Daucus carota* L. (Havuç), *Citrus nobilis* Lour (Mandalina), ve *Citrus paradisi* McFad (Greyfurt) örnekleri kullanılmıştır.

Küf tespit edilen örnekler laboratuvara getirilmiş, petri kutularındaki Malt Ekstrakt Agar (MEA) ve Patates Dekstroz Agar (Difco) besiyerleri üzerine aşılama iğnesi ile üç noktaya ekim yapılmış ve 25 °C’de 8-10 gün süreyle inkübe edilerek çürümeye neden olan küfler izole edilmiştir (Özçelik ve Özçelik, 1990; Özçelik ve Özçelik, 1996). Arka arkaya yapılan aşılama sonunda, izolatların saf kültürleri elde edilmiştir. Saf kültürü yapılan izolatların makroskopik ve mikroskopik incelemeleri yapılmış ve tür teşhisleri Samson and Van-Reenen Hoekstra (Collins ve ark., 1989), Kozakiewicz (Bradshaw, 1992) ve Hasenekoğlu (Samson ve Van Reenen-Hoekstra, 1988) ‘na göre yapılmıştır. İzolasyon ve tanımları yapılan türler Malt Ekstrakt yatık agar üzerinde 25 °C’ de 8-10 gün süreyle inkübe edildikten sonra 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Besiyerlerinin Aşılması

Mantar türleri, petri kutularındaki MEA’ a aşılansak 7-14 gün süreyle 25 °C’de inkübe edilmiştir (Özçelik ve Özçelik, 1990). Kültür üzerine 10 ml steril fizyolojik su dökülmüş ve aşılama iğnesi ile yavaşca karıştırılarak spor süspansiyonu hazırlanmıştır (Kozakiewicz, 1989). Bu spor süspansiyonundan 0.2 ml alınarak, 150 ml’lik erlenlerdeki modifiye Czapek-Dox Buyyon (mCDB)’na (glukoz, 30; maya ekstraktı, 1.0; Pepton, 10; NaNO₃, 2.0; K₂HPO₄, 1.0; KCl, 0.25; MgSO₄.7H₂O, 0.5; FeSO₄.7H₂O, 0.01; ZnSO₄.7H₂O, 0.01, (g/l distile su) aşılansak ve 25 °C’de çalkalamalı inkübatörde 150 rpm de 30 gün süreyle inkübe edilmiştir. Erlenler misel kitlesini kırmak amacıyla hergün 3 dakika süreyle elle çalkalanmıştır (Hasenekoğlu, 1991).

Ekstraksiyon

Buyyon kültürü, süzgeç kağıdından (Schleicher&Schüll, No:595) vakum yardımıyla süzülerek misel ve kültür süzüğü ayrılmıştır. Misel 50 ml destile su ile yıkanmış 85 °C’de 3 saat süreyle kurutularak ıslak ve kuru tartımlar arasındaki fark kaydedilmiştir. Kültür süzüğünden 50 ml alınarak ayırma hunisinde 3 defa 50 ml etil asetat (Merck) ile toksin ekstraksiyonu yapılmıştır (Wei ve Swartz, 1985). Toplanan ekstraktın içine 25 g susuz Na₂SO₄ katılıp 30 dakika süre ile bekletilerek suyu alınmış ve süzümüştür (Jimenez ve ark., 1991).

Kolon Kromatografisi

Suyu alınmış ekstrakt, 19x3, 3 cm boyutlarında 15 g Silika jel 60 (0.2-0.5 mm, E. Merck A.G., D-6100 Darmstadt-Almanya) ile doldurulmuş kolondan geçirilerek temizlenmiştir. Kolon 75 ml etil asetat ile yıkanmıştır (Mahmoud, 1993).

Buharlaştırma

Kolon kromatografisi uygulanan ekstrakt, 250 ml'lik cam balon içerisinde, vakum altında 50-55 °C'de döner buharlaştırıcıda yaklaşık 1 ml kalıncaya kadar buharlaştırılmıştır. Aletten çıkarılan balona 3 ml etil asetat ilave edilmiş ve karışım biyolojik ölçümde kullanılmak üzere -18 °C'de saklanmıştır (Scott ve Bullerman, 1975).

Biyolojik Ölçüm

Biyolojik ölçüm için kullanılan bakteri suşları Nutrient buyyona (Difco)'a aşılansak 30±0.1 °C de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Erlenmayer kaplarında sterilize edilen ve 45-50 °C ye kadar soğutulan Müller Hinton Agar (Oxoid), yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri suşlarının 24 saatlik buyyondaki kültürü ile aşılansak iyice çalkalanmıştır. Bakteri aşılansak besiyerileri 9.0 cm çapındaki steril petri kutularına yaklaşık 15'er ml dağıtılmıştır.

Elde edilen ekstraktlardan, otomatik pipet ile 6 mm çapındaki steril boş antibiyotik disklere (Schleicher&Schüll, Nr 2668, Almanya) 100 µl ekstrakt emdirilmiştir. Katılaşan agar üzerine ekstrakt emdirilmiş diskler hafifce bastırılarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C de 2 saat bekletildikten sonra bakteri aşılansak plaklar 32±0.1 °C de 16-18 saat süre ile inkübe edilmiştir (Özçelik ve Özçelik, 1990; Özçelik ve Özçelik, 1996; Bağcı ve Dığrak, 1996). Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlar ve Tartışma

Kahramanmaraş hal, pazaryeri ve evlerden temin edilen doğal olarak küflenmiş sebze ve meyvelerden izole edilen ve teşhisleri yapılan *Alternaria alternata* I, *A. alternata* II, *A. solani*, *Fusarium equiseti* ve *Penicillium italicum*'un modifiye Czapek-Dox Buyyon'da 30 gün süre ile inkübe edilmesi sonucunda oluşan metabolitlerin mikroorganizmalar üzerine etkisi Tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo 1. Bazı fungal metabolitlerin mikroorganizmalar üzerine oluşturdukları bakterisit etki

Mikroorganizmalar	1	2	3	4	5
<i>Bacillus megaterium</i>	22 ^a	19	20	11	16
<i>Bacillus subtilis</i>	20	22	22	16	16
<i>Enterobacter aerogenes</i>	20	18	15	18	15
<i>Proteus vulgaris</i>	16	17	18	15	13
<i>Escherichia coli</i>	22	16	14	12	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	10	10	-	-
<i>Bacillus brevis</i>	21	19	21	18	15
<i>Listeria monocytogenes</i>	12	14	10	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	- ^b	-	-	-	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-	-	-	-	-

1: *A. alternata* I 2: *A. alternata* II 3: *A. solani* 4: *F. Equiseti* 5: *P. italicum*

Etil Asetat ve Kontrol: Tüm bakteri suşları için (-); (^a) İnhibisyon zonu (mm);

(-^b) İnhibisyon zonu belirlenemedi

Tablo 1’de görüldüğü gibi *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *E. coli* ve *B. brevis*’in ekstrakte edilen fungal metabolitlere karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *Bacillus megaterium*’un aflatoksin, patulin ve *Alternaria* suşlarının oluşturduğu toksinlere karşı duyarlı olduğu belirtilmektedir (Özçelik, 1985; Özçelik ve Özçelik, 1990). Mahmoud (Mahmoud, 1993) izole ettiği *Fusarium* türlerinin zearalenone ve T₂-toksin’i ürettiğini belirtmektedir. El-Maraghy ve Salem (El-Maraghy ve Salem, 1986) kümes hayvanları ve hayvan yemlerinde *Fusarium* suşlarının oranı % 13-45 olunca toksijenik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Fungal metabolit emdirilmiş disklerin *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 ile aşılama aşarında oluşturdukları inhibisyon zonları Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Fungal metabolit emdirilmiş disklerin *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 ile aşılama aşarında oluşturdukları inhibisyon zonları.

K. pneumoniae, *A. alternata* I, II ve *A. solani* suşlarına karşı duyarlı olduğu gözlenmiş (sırasıyla 12,10,10 mm inhibisyon zonu) diğer fungus metabolitlerine karşı 100 µg/disk konsantrasyonunda dirençli olduğu tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* suşu da çalışmada kullandığımız *Alternaria alternata* I, *A. alternata* II ve *A. solani* suşlarına karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir (sırasıyla 12,14 ve 10 mm inhibisyon zonu). *F. equiseti* ve *P. italicum* türlerine karşı dirençli olduğu görülmüştür. Belirtilen fungusların metabolitleri *S. aureus* ve *M. smegmatus* suşlarına karşı 100 µg/disk konsantrasyonunda dirençli olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullandığımız mantar suşlarının oluşturdukları biyokütle miktarı Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 1 de görüldüğü gibi, *Alternaria alternata* I suşu inkübasyon süresi sonunda en fazla biyokütle oluşturmuştur (1.400 g). *Fusarium equiseti*'nin ise misel kuru ağırlığı 1.294 g olarak belirlenmiş, *A. alternata* II suşu en az misel kitlesi oluşturmuştur.

Jimenez ve ark. (Jimenez ve ark., 1991) buğday unundan izole ettikleri *Penicillium griseofulvum* tarafından patulin üretim şartlarına inkübasyon süresinin etkilerini incelemiş ve 28 °C'de 40 günde misel kuru ağırlığının 2.850 g olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 20 °C'de küf gelişmesinin yavaşladığını ve misel kuru ağırlığının 1.750 g olduğunu tespit etmişlerdir. Görüldüğü gibi, inkübasyon sıcaklık ve süresi toksin üretimi ve misel oluşumu üzerinde etkili olmaktadır.

Tablo 2. Bazı sebze ve meyvelerden izole edilen mantarların mCDB'da oluşturdukları biyokütle miktarı

İzole Edilen Mantar Suşları	Biyokütle Miktarı (g)	İzole Edilen Meyve
<i>Alternaria alternata</i> I	1.400	<i>L. esculentum</i> , <i>C.sinensis</i>
<i>Alternaria alternata</i> I	1.017	<i>L. esculentum</i> , <i>C.nobilis</i> , <i>C. paradisi</i>
<i>Alternaria solani</i>	1.033	<i>C. nobilis</i>
<i>Fusarium equisetii</i>	1.294	<i>D. carota</i> , <i>C. annuum</i> , <i>R. raphanistrum</i>
<i>Penicillium italicum</i>	1.136	<i>C. limon</i>

Dığrak ve Özçelik (Dığrak ve Özçelik, 2001), *Fusarium*, *Penicillium sp.* ve *Aspergillus sp.*'nin farklı sıcaklık, süre, pH ve Şeker varlığında belirtilen fungus türlerinin metabolitlerinin biyolojik ölçüm metodu ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada, %4.0 ve %6.0 glukoz ve fruktoz içeren modifiye Czapek Dox buyonda 25°C'de biyomas miktarının en fazla olduğunu belirmiştir.

Wei ve Swartz (Wei ve Swartz, 1985) laboratuvar şartlarında *A. alternata*'nın misel gelişimini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada misel kuru ağırlığının 4. günden itibaren 14 gün süreyle arttığını belirtmiş ve toplam toksinin en çok inkübasyonun 11. gününde oluştuğunu tespit etmişlerdir. *A. alternata* suşlarının toksin üretimi ve misel oluşturmada C/N oranının önemli rolü olduğu belirtilmektedir (Stinson ve ark., 1980). Özçelik ve Özçelik (Özçelik ve Özçelik, 1996) yaptıkları çalışmada biyokütle oluşumu bakımından en etkili şekerin fruktoz olduğunu, bu ortamda oluşan biyokütle miktarının, glukoz ve sakkaroz ortamında oluşan biyokütle miktarlarına göre önemli farklılık ($p<0.05$) gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, yapılan bu çalışmada toksin varlığını belirlemek için, *Bacillus megaterium* NRS 1581 suşu test bakterisi olarak kullanılmıştır.

Yapılan bu araştırmada bulunan sonuçlar *Staphylococcus aureus* Cowan 1 ve *Mycobacterium smegmatis* RUT dışında çalışmada kullanılan diğer bakteri suşlarının *Alternaria* toksinlerinin belirlenmesinde, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus brevis* FMC 3, *Proteus vulgaris* FMC 1, *Escherichia coli* DM ve *Enterobacter aerogenes* CCM 2531,'in ise *Fusarium sp.* ve *Penicillium sp.* metabolitlerinin biyolojik ölçüm metodu ile belirlenmesinde test bakterisi olarak kullanılabilceğini göstermiştir.

Kaynaklar

- Abdel-Gawad, K.M., Zohri, A.A., 1993. Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 124: 55-64.
- Bağcı, E., Dığrak, M., 1996. Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* (Fır) species from Turkey. *Flavour and Fragrance*, 11: 251-256.
- Bradshaw, L.J., 1992. *Laboratory Microbiology*. Fourth Edition. Printed in USA 435s.
- Buckle, A.E., Sanders, M.F., 1985. An appraisal of bioassay methods for the detection of mycotoxins-a review, *Letters Appl. Microbiol.*, 10: 155-160.
- Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M., 1989. *Microbiological Methods*. Butterworth & Co. Ltd. p 410.
- Dığrak, M., Özçelik, S. 2001. Determination of some fungal metabolite as influenced by temperature, time, pH and sugars by bioassay method. *Turk J Biol*, 25:197-203.
- El-Maraghy, S.S.M., Salem, D.A., 1986. Mycoflora and mycotoxins of feedstuff samples collected from milk production farms in Assiut Governorate. *Bull. Fac. Sci.*, 15: 11-23.
- Hasenekoğlu, İ., 1991. *Toprak Mikrofungusları*. (4 Cilt) Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 698, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Yayınları No: 11 Erzurum.
- Jimenez, M., Mateo, R., Mateo, J.J., Huerta, T., Hernandez, E., 1991. Effect of the incubation conditions on the production of patulin by *Penicillium griseofulvum* isolated from wheat. *Mycopathologia*, 115: 163-168.
- Kozakiewicz, Z., 1989. *Aspergillus* species on stored products. C.A.B. International Mycological Institute. *Mycological Papers*, 161: 1-188.
- Logrieco, A., Battolico, A., Solfrizzo, M., Mule, G., 1990. Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia*, 82 (4): 501-505.
- Mahmoud, L.E., 1993. Toxigenic fungi and mycotoxin content in poultry feedstuff ingredients. *J. Basic Microbiol.*, 33(2): 101-104.
- Özçelik, S., 1985. *Bacillus megaterium* kullanılarak patulinin biyolojik yolla ölçümü. *Gıda*, 10: 281-285.
- Özçelik, S., Özçelik, N., 1990. Interacting effects of time, temperature, pH and simple sugars on biomass and toxic metabolite production by three *Alternaria* spp. *Mycopathologia*, 109: 171-175.
- Özçelik, N., Özçelik, S., 1996. Biyolojik ölçüm yöntemi ile *Alternaria* toksinlerinin oluşumuna bazı faktörlerin ve suşların etkisinin araştırılması. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 20: 19-25.
- Pero, R.W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D., Spalding, J.W., 1973. Toxicity of metabolites produced by the *Alternaria*. *Environ. Health Perspect.*, 7: 87-94.
- Purwoko, H.M., Hald, B., Wolstrup, J., 1991. Aflatoxin content and number of fungi in poultry feedstuffs from Indonesia. *Letters Appl. Microbiol.*, 12: 212-215.
- Rovira, M., Marin, P., Martin-Ortega, E., Montserrat, E., Rozman, C., 1990. *Alternaria* infection in a patient receiving chemotherapy for lymphoma. *Acta Haematol.*, 84: 98-100.

- Samson, R.A., Van Reenen-Hoekstra, E.S., 1988. Introduction of food-borne fungi. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn. The Netherland, 689s.
- Scott, W.T., Bullerman, L.B., 1975. Influence of carbohydrate and nitrogen source on patulin production by *Penicillium patulum*. *Appl. Microbiol.*, 30(5): 850-854.
- Stinson, E.E., Bills, D.D., Osman, S.F., 1980. Sciliano, J., Ceponis, M.J., Heisler, E.G. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes and blueberries. *J. Agric. Food Chem.*, 28: 960-963.
- Stinson, E.E., Osman, S.F., Heisler, E.G., Sciliano, J., Bills, D.D., 1981. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. *J. Agric. Food Chem.*, 29: 790-792.
- Wei, C., Swartz, D.D., 1985. Growth and production of mycotoxins by *Alternaria alternata* in synthetic, semi-synthetic and rice media. *J. Food Protect.*, 48: 306-311.
- Zohri, A.A., Abdel-Gawad, K.M., 1993. Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt. *J. Basic Microbiol.* 33 (4): 279-288.