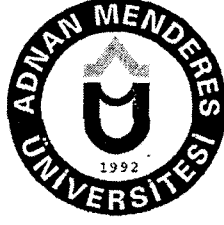


150399



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİO-YL-2004-0003**

**AYDIN YÖRESİNDE YETİŞTİRİLEN KURU İNCİRLERDEKİ
FUNGUS FLORASINA ULTRAVİYOLE IŞINLARININ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

150399

**HAZIRLAYAN: Burcu İŞMAN
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK**

AYDIN-2004

T.C
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Burcu İŞMAN'ın hazırlamış olduğu Yüksek Lisans tezi aşağıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.
.....

ADI VE SOYADI : **UNİVERSİTESİ** ;

Prof. Dr. İsmail KARABOZ

Ege Üniversitesi

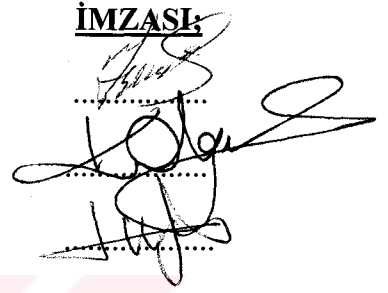
Prof. Dr. Kurtuluş OLGUN

Adnan Menderes Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Halil BIYIK

Adnan Menderes Üniversitesi

İMZA:



Jüri Üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun.....15.09.2004../21.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.....

Prof. Dr. Hatice KANDAMAR
Enstitü Müdürü



ÖZ

Bu çalışmada Aydın Ticaret Borsa'sı Özel Gıda Laboratuvar'ı ve Aydın, Nazilli ve İncirlioğa pazarlarından alınmış olan 50 kuru incir örneğinin küf florası incelenmiş ve aflatoksjenik olanlar belirlenmiştir. İzole edilen 127 izolatin *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* ve *Acremonium* olmak üzere 4 küf genusuna ait olduğu saptanmıştır. 127 izolatin 74'ü *Aspergillus*, 24'ü *Trichoderma*, 16'sı *Fusarium* ve 13'ü *Acremonium* genusuna aittir. İzole edilen 74 *Aspergillus* genusunun 16'sının *A.flavus* ve 1'inin *A.parasiticus* olduğu bulunmuştur. 17 aflatoksjenik izolatin 4 tanesinin aflatoxin ürettiği belirlenmiştir. Bu 4 izolatin 3'ü *A.flavus*, 1'i *A.parasiticus*'tur. Ayrıca UV ışınlarının kuru incirlerde üreyen küf sayısını azalttığı ve aflatoxin miktarını yaklaşık %25 oranında düşürdüğü gözlenmiştir.

ABSTRACT

In this study, the mold flora of 50 dried fig samples that were taken from Food Control Laboratory of Commodity Exchange of the Aydın Province and Aydın, Nazilli and İncirlioğa bazaars were examined and the aflatoxigenic ones were determined. It was determined that the 127 isolates which were isolated, were belongs to the genus *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* and *Acremonium*. Isolated molds are, 74 *Aspergillus*, 24 *Trichoderma*, 16 *Fusarium* and 13 *Acremonium* out of 127. It was found that the 17 aflatoxigenic isolates included 4 aflatoxigenic strains that were capable to produce aflatoxin. These are 3 *A.flavus* and 1 *A.parasiticus* out of 4. In addition, UV irradiation was found to reduce the mold count reproduced in dried figs and decreased the aflatoxin quantity in an amount of 25%.

İÇİNDEKİLER

ÖZ, ABSTRACT	I
İÇİNDEKİLER	II
ÇİZELGELER LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
KISALTMALAR SİMGELER.....	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. İncirin Ekonomik Önemi ve Aflatoksin Sorunu	1
1.2. Gıdaların Küflerle Kontaminasyonu	7
1.3. Aflatoksinlerin Genel Özellikleri	8
1.4. Mikotoksinlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri	11
1.5. Aflatoksinlerin Etki Şekilleri	13
1.6. Aflatoksinlerin Zehirlilikleri.....	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
2.1. Aflatoksin Üreten Küfler ve Etkili Oldukları Besinler	15
2.2. Aflatoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	17
2.2.1. İç faktörler	17
2.2.2. Dış faktörler.....	23
2.3. Küf Sayısının Saptanmasında Kullanılan Besiyerleri.....	23
2.3.1. Genel amaçlı besiyerleri.....	24
2.3.2. Seçici ve ayırt edici fungal besiyerleri	26
2.4. Kuru İncirlerde Küf Floraları Üzerine Yapılan Araştırmalar	29
2.5. Kuru İncirlerde Aflatoksin Üzerine Yapılan Araştırmalar	31

2.6. Ultraviyole ve Gamma Işınlmasının, Funguslar ve Aflatoksinler Üzerine Etkilerinin İncelendiği Araştırmalar	32
2.7. Aflatoksinlerin Detoksifikasyonu	36
2.8. Mikotoksinlerin Analizinde Kullanılan Genel Yöntemler	39
3. MATERYAL ve METOT	42
3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Kuru incir örnekleri.....	42
3.1.2. Besiyerleri	42
3.1.3. Çözeltiler	46
3.2. Metot	48
3.2.1. İncir homojenat ve dilüsyonlarının hazırlanması	48
3.2.2. Kuru incirlerdeki küflerin izolasyonu ve sayılarının belirlenmesi	48
3.2.3. Kuru incirlerden izole edilen küflerin tanılanması.....	49
3.2.3.1. Küf preparatlarının hazırlanması	49
3.2.4. Kuru incirlerde “Aspergillus Flavus Parasiticus (AFPA)” besiyeri kullanılarak aflatoksijenik küf uşlarının saptanması.....	49
3.2.5. Kuru incirlerden izole edilen aflatoksijenik küf uşlarının “Coconut Agar Medium (CAM)”da geliştirilmesi	50
3.2.6. Aflatoksin analizi	50
3.2.7. Ultraviyole ışınlarının kuru incirlerdeki küf florası üzerindeki etkilerinin belirlenmesi	52
4. ARAŞTIRMA BÜLGÜLERİ ve TARTIŞMA	53
4.1. Araştırma Bulguları	53
4.1.1. Yayma plaka tekniği ile kuru incir örneklerindeki küf sayısının belirlenmesi	53
4.1.2. Kuru incirlerden izole edilip tanılanmış küfler	55

4.1.2.1. Kuru incirlerden izole edilmiş olan <i>Aspergillus</i> türleri.....	56
4.1.2.2. Kuru incirlerden izole edilmiş olan küfler	57
4.1.3. Kuru incirlerden izole edilip tanılanmış aflatoksijenik küfler	57
4.1.3.1. “Coconut Agar Medium (CAM)”da floresan veren küfler	57
4.1.3.2. Aflatoksijenik <i>Aspergillus</i> türleri.....	59
4.1.4. Ultraviyole ışınlarının kuru incirlerdeki küf florası üzerindeki etkileri	71
4.1.4.1. İstatistiksel analizler.....	73
4.1.5. Aflatoksijenik küflerin ürettiği aflatoksin miktarları	75
4.1.6. UV’ye maruz bırakılan incir örneğinin aflatoksin miktarındaki değişimin belirlenmesi	80
4.2. Tartışma.....	82
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	88
ÖZET.....	91
SUMMARY	93
TEŞEKKÜR.....	95
KAYNAKLAR.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	107

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.	Türkiye’de gıda ve yemlerde bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri	4
Çizelge 2.	AB ülkelerinde, aflatoksinlere dair yürürlükteki limitler	5
Çizelge 3.	Önemli mikotoksinler, üreticileri, etkileri ve bulundukları ürünler	1
Çizelge 4.	Kserofil funguslar, mikotoksinleri ve min. a _s değerleri	1
Çizelge 5.	Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarından alınan kuru incir ezmelerinin içerdiği küf sayısı	5
Çizelge 6.	Açık olarak satılan kuru incirlerin içerdiği küf sayısı	5
Çizelge 7.	Kuru incir örneklerinden izole edilmiş olan küf genuslarının dağılımı	5
Çizelge 8.	Kuru incir örneklerinden izole edilmiş olan <i>Aspergillus</i> türlerinin dağılımı	5
Çizelge 9.	Kuru incir örneklerinden izole edilmiş olan küfler	5
Çizelge 10.	60 dakika UV ışınına maruz bırakılan incir örneklerinin toplam fungal sayım sonuçları	7
Çizelge 11.	90 dakika UV ışınına maruz bırakılan incir örneklerinin toplam fungal sayım sonuçları	7
Çizelge 12.	120 dakika UV ışınına maruz bırakılan incir örneklerinin toplam fungal sayım sonuçları	7
Çizelge 13.	60' UV ışını uygulaması sonuçlarının ortalamaları ve önem testi sonuçları	7
Çizelge 14.	90' UV ışını uygulaması sonuçlarının ortalamaları ve önem testi sonuçları	7
Çizelge 15.	120' UV ışını uygulaması sonuçlarının ortalamaları ve önem testi sonuçları	7
Çizelge 16.	60', 90' ve 120' UV uygulaması sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları ve önem testi sonuçları	7

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1	Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ ve G ₂ 'nin kimyasal yapıları	10
Şekil 2	Aflatoksin M ₁ ve M ₂ 'nin kimyasal yapısı	10
Şekil 3	'CAM' besiyerinde A. <i>A.flavus</i> 'un 27°C'de 7 günlük koloni görünümü; B. <i>A. parasiticus</i> 'un 27°C'de 7 günlük koloni görünümü; C. 'CAM' besiyerinde 365nm. UV ışık altında floresan veren <i>A. flavus</i> 'un görünümü	58
Şekil 4	<i>A. flavus</i> 'un A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidial baş(40X); C. Konidial baş (100X)	63
Şekil 5	<i>A. parasiticus</i> 'un A. MEA'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidial baş (40X)	64
Şekil 6	<i>A. niger</i> 'in A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidial baş (40X)	65
Şekil 7	<i>A. terreus</i> 'un A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidial baş(40X)	66
Şekil 8	<i>A. fumigatus</i> 'un A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidial baş (40X)	67
Şekil 9	<i>A. candidus</i> 'un A. CYA'daki 25°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidial baş(40X); C. Konidia (100X)	68
Şekil 10	<i>Trichoderma sp.</i> 'nin A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Mikroskopik görünümü (100X)	69
Şekil 11	<i>Acremonium sp.</i> 'nin A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Mikroskopik görünümü (100X).	70

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
nm.	Nanometre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
ng	Nanogram
ml	Mililitre
l	Litre
ppb	Parts per billion (milyarda bir)
kGy	Kilogray
sp	Species
UV	Ultraviyole
HPLC	High Performance Liquid Chromotography
TLC	Thin Layer Chromotography
LD	Lethal Dose

1. GİRİŞ

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için enerjiye ve bu enerjiyi sağlamak üzere temiz ve güvenilir enerji kaynaklarına gereksinim duyarlar. En önemli enerji kaynaklarımızdan biri olan gıdaların canlıların sağlığını olumsuz yönde etkilemeyecek şekilde üretilmesi gerekmektedir. Dünyada ve ülkemizde, gıdalar ile ilgili standartların sürekli yenilenerek gündemde tutulması konunun önemini vurgulamaktadır. İncir meyvesi, ülkemizin önemli gıdalarından ve ihracat ürünlerinden biridir. İncirin ülke ve dünya pazarında yer edinebilmesi için üreticiler tarafından belli kriterlerin yerine getirilmesi gerekmektedir. Bu kriterlerin en önemlilerinden biri de incirde aflatoksin oluşumunun önlenmesidir.

1.1. İncirin Ekonomik Önemi ve Aflatoksin Sorunu

İncir, *Ficus carica* L., Ege Bölgesi tarım potansiyeli içinde önde gelen ürünlerden biridir. Dünya üzerinde subtropik ve ılıman iklim kuşağında yayılış alanı bulan incir, özellikle Akdeniz ülkeleri ve Akdeniz ikliminin etkin olduğu Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya ve bazı Güney Amerika ülkeleri ile Güney Afrika gibi ülkelere özgü bir ürün olma niteliğini korumaktadır. Bu yayılış alanlarının da ortaya koyduğu gibi, kuru incir üretim alanları, iklim özellikleri ile oldukça sınırlanmıştır (Aksoy ve ark., 1987).

İncir üretiminde, yurdumuzun Ege Bölgesi, bu bölge içinde Büyük ve Küçük Menderes Vadileri, Dünyanın en ideal incir kültür alanları olup, kültür tarihi çok eskilere dayanmaktadır. Özellikle bu bölgede yetişen “ sarı lop ” inciri, meyve kabuğunun inceliği, kalın etli, şekerce zengin, yumuşak ve ballı oluşu ile, kurutmalık incirde aranan özelliklere sahip olup, birinci sınıf incir olarak dünyaca tanınmaktadır (Özay ve Alperden, 1991).

Ege bölgesinde birçok ailenin incir üretimi ile uğraştığı bilinmektedir. Bunlara incirin hasadı, işlenmesi ve pazarlanması sırasında çalışan işçi kapasitesi de

eklendiğinde incirin oldukça geniş bir sosyo- ekonomik etkinliğe sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Türkiye, kuru incir üretiminin tamamını Ege Bölgesi'nden, özellikle Aydın ve İzmir illerinden sağlamaktadır. İzmir Ticaret Odası Borsasının 1992 verilerine göre, 1988-1992 yılları arasında kuru incir üretiminin ortalamasının 48.060 ton olduğu bildirilmiştir. DİE'nin 1993 verilerine göre yurdumuzda 9.530.000 tane incir ağacı bulunmaktadır. Bunun 8.430.000 tanesi Aydın ve İzmir illerinde yer almaktadır. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü'nün 1994 verilerine göre, 1986-1993 yılları arasındaki ortalama yaş incir üretimi 311.000 tondur.

İncir yetiştirilen diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de bu ürünün yetiştirme ortamından, tüketimine kadar olan süreçte bazı fitopatolojik sorunları bulunmaktadır. Meyvelerin pazar değerlerinin düşmesine neden olan bu sorunların kaynağını, genellikle değişik funguslar oluşturmaktadır.

Funguslar ve mayalar gıdalarımızın doğal mikroflorasında yer alan mikroorganizmalardır. Funguslar, genellikle üstün antibiyotik kaynakları olarak tanınmakta, insan ve hayvanlarda toksik etki gösteren metabolitler ürettikleri daha az bilinmektedir. Fungusların sekonder metabolizmaları sonucu sentezlenen toksik maddelere genel olarak **MİKOTOKSİN** denilmektedir. Mikotoksinler, canlılarda karsinojenik, mutajenik, dermatotoksik, hepatotoksik, nefrotoksik, teratojenik ve tremorjen etkiler gösterirler. Hayvanlarda ve insanlarda akut, sub-akut ve kronik toksisite gösterirler (Eaton, 1994).

Mikotoksinlerin anlaşılmasında 1960 yılı dönüm noktası olmuştur. Bu tarihe kadar *Basidiomycota* (Şapkalı mantarlar)'nın ölümcül toksinlerinin (*Amanita muscaris*'in toksini=Amanita toksin, muskarin, küf atrofini) bilinmesine karşın, filamentli fungusların toksinleri üzerinde fazlaca bilgi toplanamamıştır. 1960'lı yılların başında bir çiftlikte ortaya çıkan etmeni belirsiz olan bir hastalık, mikotoksinler üzerinde yapılan araştırmaların hızlanmasına ve yoğunlaşmasına neden olmuştur. Çok sayıda hindinin ölümüne yol açan bu hastalık etmeninin saptanması amacıyla yapılan çalışmalar sonucu, hastalığın ortaya çıktığı çiftlikte

kullanılan yemlere katılan yer fıstığı unlarının toksik özellikler taşıdığı saptanmıştır. Toksik özellikler taşıyan yer fıstığı unlarının küf hifleri ile bulaşık olduğu gösterilmiş ve hayli toksik olan yer fıstığı örneklerinden saf kültür olarak izole edilen küf izolatlarından bir tanesinin, sentetik besiyerinde hindi X hastalığı (turkey X disease) semptomlarını veren, ve difurankumarin yapıda olan bir toksini ürettiği saptanmıştır. Bu toksini üreten küfün *Aspergillus flavus* link olduğu tanımlanmış ve bu küfün ismine ithafen “aflatoksin” adı verilmiştir (Karapınar, 1981). 1962 yılında da, aflatoksinlerin güçlü bir “hepatotoksik” ve “hepatokarsinojen” etkisi olduğu anlaşılmıştır (Bullerman, 1979; Betina, 1989).

Aflatoksinin bulunuşu ile toksik etkiye sahip fungal sekonder metabolitler önem kazanmış ve 40 yıldır üzerinde sayısız araştırmaların yürütüldüğü oldukça geniş bir madde grubu oluşmuştur. Bugün geline nokta insanları bu toksik grubun etkilerinden korumak amacıyla mikotoksinlerin gıda ve yemlerde bulunabilecek (tolere edilebilir) en yüksek miktarları yasal düzenlemelerle belirlenmekte, her ülkenin sınır değerleri farklı olsa da uluslar arası ticarete belli normlara yaklaşmak için çaba sarf edilmektedir.

Tarım ve Köyşleri Bakanlığı’nca 560 sayılı Gıdaların Üretimi Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararname gereğince hazırlanan 16 Temmuz 1997 tarih ve 23172 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan ve Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’ne göre hazırlanan Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliği’ ne göre Türkiye’de gıda ve yemlerde kabul edilebilir aflatoksin düzeyleri Çizelge 1’de, AB ülkelerinde, aflatoksinlere dair yürürlükteki limitler ise Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 1. Türkiye’de gıda ve yemlerde bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri (ppb) (Resmi gazete, 1997; Resmi gazete, 1991).

<i>GIDA MADDESİ</i>	<i>MAKSİMUM SEVİYE (ppb)¹</i>				
	<i>AFLATOKSİN</i>			<i>OKRATOKSİN-A</i>	<i>PATULİN</i>
	<i>B₁</i>	<i>B₁+ B₂+ G₁+G₂</i>	<i>M₁</i>		
Fındık yer fıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir, üzüm ve kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5	10			
Tahıllar 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					
İşlenmemiş tahıl taneleri (çeltik ve karabuğday dahil)				5	
Tahıllardan elde edilen bütün ürünler (tahıl bazlı işlenmiş ürünler ve doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl taneleri)				3	
Kuru üzüm				10	
Elma suyu ve elma suyu içeren içecekler ve sirkeler					50

¹ ppb: parts per billion (milyarda bir)

Çizelge 2. AB ülkelerinde, aflatoksinlere dair yürürlükteki limitler (www.ordutarim.gov.tr).

AFLATOKSİN	TİPİ	GIDA MADDESİ	KABUL EDİLEBİLİR EN YÜKSEK DEĞER (ppb= µg/kg)
B ₁	M	Baharat	5
B ₁	M	Tahıl ve tahıl ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya bir gıda maddesinin üretiminde bileşen olarak kullanılan)	2
B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M	Tahıl ve tahıl ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya bir gıda maddesinin üretiminde bileşen olarak kullanılan)	4
B ₁	M	Tüm gıda maddeleri (diğer) ²	5
B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M	Tüm gıda maddeleri (diğer) ²	10
B ₁	M	Bebek mamaları ve bebek gıdaları	1
B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M	Bebek mamaları ve bebek gıdaları	2
B ₁	M	Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya benzeri fiziksel işlemler görecektir olan yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar ve kurutulmuş meyveler	5
B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M	Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya benzeri fiziksel işlemler görecektir olan yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar ve kurutulmuş meyveler	10
B ₁	M	Doğrudan tüketime sunulacak veya bir gıda maddesinin üretiminde bileşen olarak kullanılacak yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	2
B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M	Doğrudan tüketime sunulacak veya bir gıda maddesinin üretiminde bileşen olarak kullanılacak yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	4
M ₁	M	Peynir	0.25
M ₁	M	Süt, Bebek mamaları ve devam formülleri	0.05
M ₁	M	Süt tozu	0.50

² Bulunması muhtemel gıdalar

Kuru incirlerde aflatoksin sorunu ülkemizde ilk kez, 1972 yılında Danimarka'ya ihraç edilen kuru incirlerimizde yapılan analizler sonucunda, 938 ppb aflatoksin B₁ saptanmasıyla gündeme gelmiştir (Anon. 1990). 1974-1975 üretim sezonunda ise ABD'ye gönderilen 38 parti kuru incirden 3 partide aflatoksin saptanmış ve bu partiler Türkiye'ye geri gönderilmiştir. 1973 yılından 1986 yılına kadar geçen sürede kuru incir dış satımımızda aflatoksin ile ilgili herhangi bir darboğaz yaşanmamıştır. 1986 yılında ise İsviçre'ye gönderilen 1985 yılı ürününde, bu ülkenin ilgili kuruluşlarınca yapılan analizler sonucunda tolerans sınırları üzerinde aflatoksin belirlendiğinin bildirilmesi ile konu yeniden güncellik kazanmıştır (Gül, 1992).

Aflatoksinler, *A. flavus* grubu funguslardan olan *A. flavus* ve *A. parasiticus* ve nadiren de *Aspergillus nomius* tarafından çok çeşitli gıda maddeleri üzerinde salgılanmaktadır (Ito, 2001). Son yıllarda ekonomik kayıplarının yanında, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri konunun önemini daha da arttırmaktadır. Bu ekonomik kayıplar, şüpheli besinlerin alıcılar tarafından reddedilmesi veya boykot edilmesinden kaynaklandığı gibi kontrol ve analiz harcamalarından da oluşmaktadır.

Son yıllarda diğer incir üreticisi ülkelerin, dış pazarlara temiz ve kaliteli kuru incir sunmak amacıyla, yoğun çabalar içinde oldukları gözlenmektedir. Bu olgu gerek üretim gerekse dış satım yönünden önde geldiğimiz bu konuda ivedilikle verimi artırıcı ve kaliteyi yükseltici önlemlerin alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Bunun yanısıra üretimin planlanması, dış pazar isteklerine uygun işlemlerin yapılarak dış satımın artırılması da büyük önem taşımaktadır. Bunların sağlanması ise incirin yetiştirme ortamından tüketime kadar olan süreçte karşılaştığı sorunların çözülmesiyle olabilir. Bu sorunların başında hiç kuşkusuz hastalık ve zararlılar gelmektedir. Bu konuda TÜBİTAK desteğinde 1981-1984 yıllarında yapılan çalışmada birçok soruna çözüm getirilirken gelecekteki araştırmalara konu olabilecek sorunlar da uyarı niteliğinde ortaya konmaya çalışılmıştır. Ancak, kuru incir meyvelerinde aflatoksin oluşumu konusu bu çalışma kapsamı dışında kalmıştır (Özar ve ark., 1986).

İncir, aflatoksijenik funguslardan olan *A. flavus* ve *A. parasiticus*' un gelişimi için duyarlı bir ürün olduğundan (Buchanan ve ark., 1975; Steiner ve ark., 1988; İçibal ve Altuğ, 1992), Ege Bölgesi'nde üretilen kuru incirimiz yüksek oranda aflatoksin ile bulaşabilmektedir (Karapınar ve ark., 1989).

Bütün bu nedenlerle, gıda ve yemlerde aflatoksin oluşumunun önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde öncelikle hammaddenin tarlada gelişimi, hasatı, depolanması, nakliyesi, ürüne işlenmesi ve ürün elde edilmesi aşamalarındaki küf kontaminasyonunun engellenmesi veya en aza indirilmesi önem taşımaktadır. Mikrobiyal kontaminasyonu tarlada kontrol altında tutmak zordur. Ancak, mikrobiyal kontaminasyon, ürünün hasatı ve onu izleyen aşamalarda alınacak hijyen ve sanitasyon önlemleri ve bilinçli uygulamalarla büyük ölçüde engellenebilir. Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde ikinci ve daha da önemli adım ise hammadde, ara ürünler ve son ürüne çeşitli şekillerde bulaşan küf veya küflerin önlenmesidir. Bu da üretimde iyi bir teknoloji kullanma ve bilinçli uygulamalarla mümkün olabilir. Ancak küflerin gelişme isteklerinin az olması ve buna bağlı olarak da hemen hemen her yerde ve her koşulda üremeleri nedeniyle, mikotoksin oluşumunun önlenmesinde büyük güçlükler yaşanmakta ve çoğu kez başarısız kalılabilmektedir. Aflatoksin kontaminasyonunun önlenemediği durumlarda üründen aflatoksinin uzaklaştırılması ve detoksifikasyon amacıyla çok sayıda araştırma yapılmakta ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik birçok yöntem denenmektedir.

Çalışmamızda aflatoksin oluşumu için duyarlı bir ürün olan kuru incirin küf florasının ve bu flora içinde aflatoksin oluşturan fungal türlerin belirlenmesi ve ultraviyole ışınlarının kuru incirde bulunabilecek toplam küf, aflatoksijenik küf ve aflatoksinler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.2. Gıdaların Küflerle Kontaminasyonu

Tarımsal ürünler, hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında, ortam koşullarına, tarım ürününün bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak değişik

küflerle kontamine olurlar. Bu küflerden bazıları da aflatoksin oluşumuna neden olmaktadır.

Gıdaların küflerle kontaminasyonu iki yolla gerçekleşir.

- 1) Gıdanın gözle görülür şekilde küflenmesi; bu şekilde, mikotoksin direkt olarak bulaşır. Fakat gözle görünür şekilde küflenmiş ürün işlenmeyeceğinden ve tüketilmeyeceğinden risk taşımaz.
- 2) Ürün partilerinin çok az bir kısmının küflenmesi; özellikle depolanma sırasında mikotoksin riskini artırır.

Bitkisel ürünlerde mikotoksin kontaminasyonu tarlada olgunlaşma evresinden başlayarak, hasatta, kurutmada ve ağırlıklı olarak depolanma evresinde olur. Yer fıstığı, fındık, incir gibi ürünlerde toksin kontaminasyonu hasat edilen ürünlerin kurutma aşamalarında başlar. Kırılan, hasar gören fındık fıstık kabukları, küf misellerinin iç taneye geçişine ve mikotoksin oluşturmasına olanak sağlar.

Küflerle kontaminasyon 2 açıdan önemlidir:

- 1) Tarımsal ürünlerde bozulmalara, ürünün besin değerinde kayıplara, tanelerin çimlenme yeteneklerinde düşümlere, özet olarak ekonomik kayba neden oldukları için önemlidirler.
- 2) Gıda ve yemlerde gelişen funguslar, gelişme sürecini tamamladıktan sonra, miselleri içerisinde toksik metabolitler oluştururlar ve bunları bulundukları ürüne salgırlar. Bu toksik metabolitler insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır.

1.3. Aflatoksinlerin Genel Özellikleri

Aflatoksinlerin, Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boylu UV ışığı altında aflatoksin B₁ ve B₂'nin mavi, aflatoksin G₁ ve G₂'nin ise yeşil floresan vermesi ile ilişkilidir (Bullerman, 1979; Groopman, 1988). Aflatoksin B₂, B₁'in; aflatoksin G₂ de G₁'in dihidro türevleridir (Betina, 1989) (Şekil1). Ayrıca aflatoksin B₂ ve G₂ "in vivo" koşullarda metabolik olarak B₁ ve G₁'e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler (Groopman, 1988).

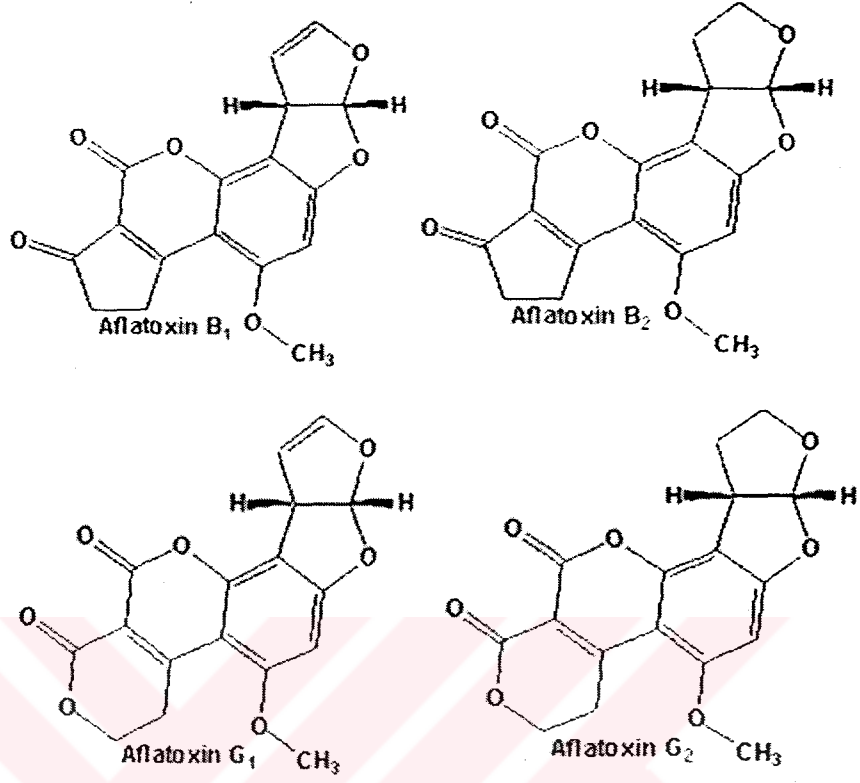
Bu dört aflatoksin dışında, aflatoksin M₁ ve M₂ olarak adlandırılan önemli iki aflatoksin türeği daha bulunmaktadır. M toksinleri, aflatoksinli yemle beslenen laktasyon devresindeki memeli hayvanların sütlerinden ve idrarlarından izole edilmiştir (Bullerman, 1979; Betina, 1989). Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boylu UV ışığı altında mavi floresan verirler. Aflatoksin M₁ ve M₂, aflatoksin B₁ ve B₂'nin hidroksi türevleridir (Betina, 1989) (Şekil 2). Bunlara ek olarak ayrıca, gerek küflü kültür ortamlarında ve gerekse de vücutta şekillenenlerle beraber, aflatoksinlerin sayısı 20'yi geçmiştir.

Aflatoksinler, kloroform, metanol ve diğer birçok organik çözücünde çözünebilmektedirler. Ancak sudaki çözünürlükleri azdır (10-30 µg/ml) (Groopman, 1989; Stoloff, 1977).

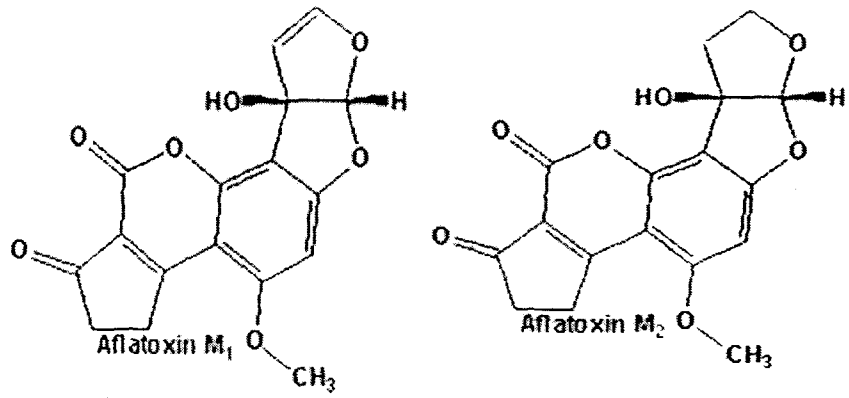
Aflatoksinler, UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorblarlar ve aflatoksin B₁ ve B₂ için 425nm'de; aflatoksin G₁ ve G₂ için ise 450nm'de floresan emisyonu oluştururlar (Groopman, 1989; Scott, 1978).

Aflatoksinler ısıya karşı oldukça dayanıklı olup, erime noktaları AFB₁ için 269°C, AFB₂ için 288°C, AFG₁ için 245°C, AFG₂ için 239°C dir (Eaton, 1994).

Aflatoksinler, gıda ve yem maddelerinde çok stabildirler, ancak çok düşük veya çok yüksek pH'larda (3'den az ve 10'dan büyük), okside edici ajanlarla ve oksijen olan ortamda UV ışığına maruz kaldıklarında hızla aktivasyonlarını yitirirler (Groopman, 1989, Stoloff, 1977).



Şekil 1 Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂'nin kimyasal yapıları.



Şekil 2 Aflatoksin M₁, ve M₂'nin kimyasal yapısı.

1.4. Mikotoksinlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri

Mikotoksinler içinde yüksek organizmalara en etkili olanlar; aflatoksinler, *Fusarium* türlerinin oluşturduğu trikotesenler, fumonisinler ve okratoksin A'dır. Canlılarda, alınan mikotoksin dozuna bağlı olarak 6 farklı etki görülebilir.

1. **Akut toksik etki:** Yüksek dozda alındıklarında akut toksik etki oluşur ve gıda veya yemin tüketilmesinin ardından kısa sürede ölüm görülebilir. Ayrıca, iştahsızlık, solunum güçlüğü, burun akıntısı, durgunluk, kansızlık, öksürük, çarpınmalar, bitkinlik, akut karaciğer hasarı, kapiller damar dayanıklılığının azalması sonucu doku ve organlarda kanama ve hızlı ölümle (birkaç saat- birkaç gün içinde) seyreder. Ölüm oranı %15-25 arasında değişir ama ciddi durumlarda %100'e kadar çıkabilir (Kaya, 1991). Akut toksik etkiye bireyin duyarlılığı, genetik ve fizyolojik özellikleri ve çevresel faktörler etkendir (Bullerman, 1979).
2. **Subakut etki:** Bir kısmı subakut etkiler gösterir. Subakut olaylarda sarılık, hematom, kanamalı barsak yangısı, trombosit sayısında azalma ve yukarıda sayılan belirtiler şiddeti azalmış şekilde dikkat çeker (Kaya, 1991). Akut ve subakut olaylarda etkilenen hedef organ özellikle karaciğerdir.
3. **Kronik etki:** Daha az dozların uzun süre alınmaları sonucunda kronik hastalıklar görülür. Bunlar; özellikle karaciğer, böbrek gibi organlarda hastalıklar, dejenerasyonlar, bağışıklık sisteminde bozukluklar, kusurlu ve eksik organ oluşumları, deri nekrozları, üremede azalma ve kilo kaybı gibi bozukluklardır (Kaya, 1991).
4. **Bağışıklık sisteminin baskılanması:** Aflatoksinler hem doğal (makrofajlar ve komplement aracılı) ve hem de kazanılmış direncin (hücrel ve humoral) baskı altına alınmasına yol açar. Karaciğere ek olarak, timus da aflatoksinlere hedef organlardan biridir. Aflatoksinler, komplement (C4), interferon, IgG ve IgA'nın oluşumunu, akyuvarların göçünü, lenfoblastların gelişmesini ve fagositlerin etkinliğini baskı altına alırlar. Bu etkileri ile vücuttan

mikroorganizmaların atılması engellenirken. diğer yandan da antijenlerin bağışıklık sistemine sunulması baskı altına alınır (Kaya, 1991).

5. **Biyokimyasal etkiler:** Aflatoksinlerle zehirlenmede, klinik belirtiler ortaya çıkmadan çok önce, gıdadaki toksin düzeyine ve maruz kalma süresine göre, hücre ve dokulardaki hasarla ilgili birçok biyokimyasal değişiklik de şekillenir. Serum alkali fosfataz, aldolaz, laktik dehidrogenaz, ornitin karbamil transferaz, ALT (alanin aminotransferaz veya SGPT), AST (aspartat aminotransferaz veya SGOT) ve izositrik dehidrogenaz etkinliği ve bilirubin düzeyi artarken, serum protein, protein kaynaklı olmayan azot, üre ve Hb miktarı azalır ve pıhtılaşma proteinlerinin miktarı önemli ölçüde düşer (Kaya, 1991).
6. **Karsinojenik etki:** Aflatoksinler bilinen en güçlü karaciğer karsinojenidirler. Aralarında maymunların da bulunduğu çok sayıda hayvanda kanser oluşumuna yol açarlar. Bu özelliklerine bakılarak, aflatoksinlerin insanlarda karaciğer kanserine neden olmak bakımından etken olabileceği konusu geniş epidemiyolojik incelemelere ve önemli tartışmalara neden olmuştur. Hayvanlara benzer biyolojik sistemlere sahip olan insanların da, duyarlı hayvanlara benzer şekilde cevap verebilecekleri dikkate alınır, aflatoksinlerle kontamine olan, özellikle yağlı tane besinlerini sürekli biçimde yemeye maruz toplumlarda birincil karaciğer kanseri ile aflatoksinler arasında sıkı bir ilişki bulunması kaçınılmazdır (Eaton, 1994). Asya ve Afrika'nın çeşitli ülkelerinde yapılan çalışmalarda; karaciğer kanserine yakalanma sıklığı ile, aflatoksinle kontamine olmuş gıdaların tüketim düzeyi arasında kuvvetli bir ilişki gözlenmiştir (Öztürk, 1995).

Mikotoksinlerin vücutta etkili oldukları organ ve dokulara göre veya etki mekanizmalarına bağlı olarak çeşitli etkilerinden söz edilir. Karaciğere etki edenler “**hepatotoksik**”, deriye etkili olanlar “**dermatoksik**”, böbreklerde toksik etki yapanlar “**nefrotoksik**”, sinir sistemine etki edenler “**nörotoksik**”, bağışıklık sistemini etkileyenler “**immunotoksik**” olarak tanımlanırlar. Toksik etkilerinden başka; mutajenik, karsinojenik (genetik özellikleri bozan), teratojenik (ana

rahmindeki fetüsün zarara uğramasına neden olan), halusinojenik, östrojenik ve tremorjen (titreme) etkileri de görülebilmektedir (Eaton, 1994).

Yem ve besinlerle alınan aflatoksinler, sindirim kanalından sınırlı ölçüde emilirler. Dolaşıma geçen toksinler plazmadan çabuk ayrılırlar; başlıca karaciğer ve kaslarda dağılım gösterirler. Vücuda giren AFB₁'in %85-90'ı ilk 24 saat içinde dışkı (%75 kadarı), idrar (%15-20 kadarı) ve sütle, değişmemiş hali ve metabolitleri şeklinde çıkarılır. Dışkıyla bu ölçüde atılması ağızdan alınan toksinin sindirim kanalından sınırlı ölçüde emildiğini gösterir. Kontamine yem veya mikotoksinin verilmesinin durdurulmasını takiben 3-6 gün sonra sütle, 6-9 gün sonra da idrar ve dışkıda aflatoksin kalıntılarına rastlanmaz (Kaya, 1991).

1.5. Aflatoksinlerin Etki Şekilleri

Mikotoksinlerin çeşitli biyolojik etkileri, onların reaksiyonca aktif kimyasal yapılarından ileri gelir. Küçük molekülü bu bileşikler, metabolizmada önemli işlevleri olan çok sayıdaki molekülün reseptörleri olarak davranırlar. DNA, RNA, fonksiyonel proteinler, enzim kofaktörleri ve membrandaki kimyasal yapılar ile reaksiyona girerler; hormon aktivitelerini etkilerler; biyosentez yollarını ve enerji üretimini inhibe ederler (Eaton, 1994).

Aflatoksinler doğrudan etkili değildirler; sitozolik ve sitokrom P-450 sistemiyle birçok metabolite çevrilirler. Karaciğerde sitokrom P-450 aracılığıyla uğradıkları metabolik değişiklikler sonucu oluşan epoksit-türevleri (AFB₁-2,3-epoksit gibi) ile etkili olurlar. Klinik olarak zehirli ve karsinojenik etkileri hemen tümüyle bu etkin metabolitle ilgilidir. Şekillenen epoksit-türevleri özellikle karaciğerdeki DNA, sitoplazmadaki steroid hormon reseptörleri, enzimler gibi birçok büyük moleküle kovalent bağlanırlar. Steroid hormon reseptörlerine bağlanmaları ribozomlarda bozulmalara yol açabilir (Eaton, 1994).

Örneğin AFB₁'in etki mekanizması, toksin molekülünün DNA ve RNA'ya bağlanarak RNA-polimeraz enziminin çalışmasını inhibe etmesi şeklindedir. Böylece özellikle RNA (mRNA) sentezindeki değişiklikten etkilenen protein sentezi

yapılamaz.. RNA polimeraz etkinliğinin engellenmesi, enzime aflatoksinin doğrudan etkisinden çok, toksin-kromatin etkileşmesi sonucu bozulan kromatin kalıp etkinliğinin dolaylı bir sonucudur. Yani aflatoksinler DNA'ya bağlanarak mRNA sentezini (yazım) önlerler; diğer bir ifadeyle, RNA polimerazın engellenmesi sonucu DNA'nın yazımı bozulur ve sonuçta DNA'ya bağlı RNA sentezi ve sonuçta bazı protein ve enzimlerin sentezi de azalır (Eaton, 1994).

1.6. Aflatoksinlerin Zehirlilikleri

Evcil hayvanlarda ve deney hayvanlarında aflatoksinlerin zehirliliği; hayvanın cinsi, cinsiyeti, ırkı, yaşı, alınan toksinin çeşidi ve miktarı, maruz kalma süresi gibi pek çok faktörden etkilenir. Zehirlilikleri ayrıca, riboflavin ve ışığa maruz kalmakla, vitamin B₁₂, karoten ve protein noksanlıklarında artar. Evcil hayvanlar içinde erkekler dişilerden daha duyarlıdır. Bu durum aflatoksinlerin metabolizmasına cinsiyet hormonlarının karıştığı fikrini verir (Kaya, 1991).

Mikotoksinlerin insanlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için en duyarlı hayvanlar olan ördek yavruları, fareler ve ratlar kullanılır. Bir mikotoksinin toksisitesi, belli bir hayvan türü için onun letal dozu ile belirtilir (AFB₁'in LD₅₀ değeri 0,5-10mg/kg arasında değişir.) (Carnaghan, 1965).

Zehirlilik bakımından en güçlü olanı AFB₁'dir. Bunu azalan sırayla AFG₁, AFB₂ ve AFG₂ izler. AFM₁'in etki gücü AFB₁ ölçüsündedir. AFB₂'nin etki gücü AFB₁'in ancak %1-10'u kadardır. Bu durum alınan AFB₂'nin vücutta önce AFB₁'e ve sonra da etkin metabolitlere dönüştürülmesi ile ilgilidir.

2. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Aflatoksin Üreten Küfler ve Etkili Oldukları Besinler

Bütün haldeki parçalanmamış ve zedelenmemiş meyve ve sebze gibi bitkisel gıdaların yüzeylerinde kendilerine özgü bir mikroflora hakimdir. Meyve ve sebzelerin işlenmelerinde ve depolanmalarında, yüzeydeki bu mikroflora ve sonradan kontaminasyonlarla gıdalara geçen mikroorganizmalar, bu ürünlerde birçok değişime neden olurlar. Mikrobiyolojik kökenli bu değişimler, meyve ve sebzelerde oluşan diğer birçok kimyasal ve fiziksel değişimlerle de yakından ilgilidir. Bu değişimler sonucu kalite düşer, tat ve yapı bozulur ve sonunda meyve ve sebzeler tüketilemeyecek bir hal alabilirler (Cemeroğlu ve Acar, 1986).

Mayalar ve küfler, genel olarak meyve ve meyve ürünlerinin doğal mikroflorasını oluştururlar. Pitt ve Hocking (1985) meyvelerde, asidik yapıları nedeniyle sorun yaratan mikroorganizmalar arasında bakterilerden çok küflerin önemli olduğunu ve meyve çeşidine göre etkin olan küf cinslerinin farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Küflerin, meyvelerde gelişerek gıdanın tüketilemeyecek görünümüne gelmesine ve toksik metabolitler oluşumuna neden olması, gıdalarda küflerin önemini ortaya koymaktadır.

Dünya üzerinde yaygın olarak bulunan ve mikotoksinleri ile çeşitli zararlara neden olan küf genusları arasında en önemli 10 tanesi; *Aspergillus* Mich.ex Fr., *Penicillium* Link, *Fusarium*, *Claviceps* Tul., *Stachybotrys*, *Pithomyces* Ber., *Phoma* Sacc., *Myrothecium* Tode., *Alternaria* Nees ex Fr., ve *Diplodia* Fr. olarak belirtilmektedir. Bunlardan en yaygın olanları ve en fazla sorun oluşturanları *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* genuslarına ait toksik küflerdir. Aflatoksinlerin keşfinden sonra yapılan araştırmalar, bu 3 önemli genustaki türler tarafından üretilen toksinleri kapsayacak şekilde genişletilmiştir (Topal, 1986).

Çizelge 3'de önemli mikotoksinler, üreticileri, etkileri ve bulundukları ürünler verilmiştir.

Çizelge 3. Önemli mikotoksinler, üreticileri, etkileri ve bulundukları ürünler .

MİKOTOKSİN	TOKSİNİ ÜRETEEN FUNGUS TÜRLERİ	MEMELİ HAYVANLARA ETKİLERİ	BULUNDUĞU ÜRÜNLER
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Hepatotoksik, kanserojen, teratojen (AFB ₁)	İncir, yer fıstığı, fındık vb. yem, süt, peynir
Bisoklamikasit	<i>Byssochlamys fulva</i> (<i>Paecilomyces variotii</i>)	Kanama	Meyve suları
Sitrinin	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Aspergillus terreus</i>	Nefrotoksik, nörotoksik	Pirinç, arpa ve unları, fasulye
Siklopiazonikasit	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (<i>Pen. cyclopium</i>), <i>Pen. griseofulvum</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Hepatotoksik, kanserojen	Un, fasulye, yem, et ürünleri
İzlanditoksin	<i>Penicillium islandicum</i>	Hepatotoksik	Pirinç
Luteoksikrin	<i>Penicillium islandicum</i>	Hepatotoksik, kanserojen	Pirinç, yem
Maltorisin	<i>Aspergillus oryzae</i>	Hepatotoksik	Malt embriyosu
Okratoksin	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus alutaceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> (<i>Pen. viridicatum</i>), <i>Penicillium aurantiogriseum</i> (<i>Pen. cyclopium</i>)	Nefrotoksik, hepatotoksik, teratojen, immunosupresif	Tahıllar, sebzeler, domuz eti, balık ürünleri, malt
Patulin	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium patulum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Aspergillus giganteus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	Nörotoksik, hücreye toksik	Meyveler, meyve suları, malt embriyosu
Penisilikasit	<i>Penicillium martensii</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>Aspergillus alutaceus</i>	Hepatotoksik, nefrotoksik, teratojen	Pirinç, pirinç unu
Psoralen	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Dermatoksik, mutajen	Sebze (kereviz)
Rubratoksin	<i>Penicillium rubrum</i> , <i>Penicillium purpurogenum</i>	Hepatotoksik, teratojen	Tahıllar
Sporidesmin	<i>Pithomyces chartarum</i>	Hepatotoksik, dermatoksik	Delice otu
Sterigmatosistin	<i>Bipolaris species</i> , <i>Eurotium amstelodamii</i>	Kanserojen	Buğday, yer fıstığı
Trikotesenler (Diasetoksisirpenol, T-2 Toksin, Nivalenol)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Myrothecium roridum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichothecium roseum</i>	Alimentary Toxic Aleukia (ATA), düşük dozlarda kusma, lökopeni, deri nekrozları	Tahıllar, fasulye, meyve ve sebzeler
Zearalenon (F-2 Toksin)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium equiseti</i>	Östrojen benzeri etki	Mısır, buğday, fasulye, pirinç, yem

Aflatoksinler, özellikle *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tamaris* ve *Aspergillus nomius* türleri tarafından üretilen, toksik ve karsinojenik etkileri olan, poliketid türevi sekonder metabolitlerdendir (Kurtzman CP, 1987). *Aspergillus flavus*, aflatoksin B₁ ve aflatoksin B₂'yi ve diğer bir mikotoksin olan siklopiazonik asidi üretirken; *Aspergillus parasiticus* B toksinlerine ek olarak G₁ ve G₂ aflatoksinlerini de üretir, fakat siklopiazonik asit üretmez (Horn BW 1996). *Aspergillus flavus*'un aflatoksinleri ve siklopiazonik asidi üretme genetik kapasitesi oldukça değişkendir. *Aspergillus flavus*'un birçok suşu toksijenik değildir ve *Aspergillus flavus*'un toprak popülasyonlarının toksijeniteleri coğrafik bölgelere göre değişmektedir (Horn, B.W., 1999). Buna karşılık, *Aspergillus parasiticus* yüksek oranlarda aflatoksin üretir ve toksijenik olmayan suşları nadir gözlenir (Horn, B.W., 1996).

2.2. Aflatoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

2.2.1. İç faktörler

Tarımsal ürünlerde mikotoksinlerin ve özellikle de aflatoksinlerin oluşumu, uygun koşullar altında kontaminasyona duyarlı olan ürünlerin çoğunda yaygın bir sorundur. Bu ürünlerde küf büyümesini ve dolayısıyla toksin üretimini etkileyen faktörler vardır. Bunlar: Fungal tür çeşitliliği ve suş varyasyonu; konukçu bitki veya tarımsal ürünün hassasiyeti, türü, yaşı; konukçu bitkinin sağlığı; ürün geliştirme teknikleri; toprak özellikleri; böcekler; kuraklık; nem içeriği; sulama; ürün kompozisyonu; mekanik hasar; sıcaklık; mikrobiyal popülasyon; oksijen bulunabilirliği; diğer toksinlerin varlığına bağlı olarak sinergistik etki; herbisit, pestisit kullanımı ve pH olarak belirtilmektedir (Ciegler, 1978). Bunların aralarında en önemlileri; nem/su aktivitesi, substrat tipi ve sıcaklıktır (Lieu ve ark., 1977; Ciegler, 1978; Northolt ve ark., 1981; Park ve ark., 1983). Fakat her şeyden önce tarımsal ürünün veya gıdanın küf spektrumunda bulunan küflerin potansiyel mikotoksin üreticisi olup olmadıkları önem taşır.

Tarım ürünü veya gıdanın nem içeriği, atmosfer bağıl neminden etkilendiği için, sıcaklıkla beraber bağıl nem, öncelikle fungus sporlarının çimlenmesini ve misellerin gelişmesini ardından da toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Fungusların gıda maddeleri üzerinde gelişebilmeleri ve toksin oluşturmaları, atmosferin bağıl nem oranı arttıkça kolaylaşır. Bir başka ifade ile fungusların gıdalarda gelişme ve toksin oluşturmaları, gıdanın düşük su aktivitesi (a_s) değeri ile sınırlandırılabilir veya engellenebilir. A_s değeri, mikroorganizmaların kullanımlarına elverişli, gıda içinde bağlı olmayan suyu ifade eder.

Funguslar, bakterilerle kıyaslandıklarında daha düşük bağıl nemde gelişebilirler. Optimum gelişmeleri için min. a_s : 0.97-0.99 değerlerini istemelerine karşın min. a_s : 0.80-0.85 değerlerinde de rahatlıkla çimlenebilir ve gelişebilirler. Kserofilik *Eurotium* türleri ve *Monascus* (sin. *Xeromyces*) *bisporus* min. a_s : 0.61-0.62 değerlerinde bile varlıklarını sürdürebilirler. *Aspergillus* türlerinin min. a_s : 0.80 değerlerinin altında, min. a_s : 0.70-0.71 değerlerinde bile gelişebildikleri görülür. Bu yüzden *Aspergillus* türleri kserofilik türlerden sayılırlar.

Mikotoksin üretimi için gereken min. a_s değerleri, gelişim için istenen min. a_s değerlerinden daha yüksektir. Her bir mikotoksin, kendisini sentezleyen küf türüne bağlı olarak farklı a_s değerinde oluşturulur. Örneğin *Aspergillus flavus* aflatoksini sentezlemek için min. a_s : 0.83-0.87 değerini, *Aspergillus parasiticus* ise min. a_s : 0.87 değerini ister.

Önemli bir büyüme faktörü olan su aktivitesi (a_s)'nin aflatoksijenik küfler üzerindeki etkileri de çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Northolt ve Soentoro (1981), *Aspergillus* türlerini de içeren depo küflerinin $a_s < 0.75$ 'de büyüebildiğini; aflatoksin B₁'in büyüme için gerekli olan minimum sıcaklık ve a_s koşulları altında oluşturulabildiğini ayrıca tarımsal ürünlerdeki fungal büyümenin, su aktivitesinin 0.65'in altına düşürülmesi ve bu seviyede tutulmasıyla engellenebileceğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4'de kserofil funguslar, bunların mikotoksinleri ve minimum su aktivitesi değerleri verilmiştir.

Çizelge 4. Kserofil funguslar, mikotoksinleri ve min. a_s değerleri.

<i>FUNGUSLAR</i>	<i>GELİŞME</i>	<i>TOKSİN OLUŞUMU</i>	<i>MİKOTOKSİNLER</i>
<i>Aspergillus clavatus</i>	0.85	0.99	Patulin
<i>Aspergillus flavus</i>	0.78	0.83-0.87	AFB ₁ , aspergillik asit, aspertoksin
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.82	-	Fumagilin, gliotoksin
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0.78	0.87	AFB ₁
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.76	0.83-0.87 0.80-0.88	Okratoksin A Penisilik asit
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.74	-	Sterigmatosistin
<i>Emericella nidulans</i>	0.78	-	Sterigmatosistin
<i>Eurotium</i>	0.62	-	Fisikon, ekinulin, ksantosilin
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0.79	0.97-0.99 0.87-0.90	Penisilik asit Okratoksin A, tremortin A ve B, penisilik asit, siklapiazonik asit
<i>Penicillium expansum</i>	0.82	0.99	Patulin, sitrinin
<i>Penicillium griseofulvum</i>	0.81	0.85-0.95	Patulin
<i>Penicillium islandicum</i>	0.83	-	İzlanditoksin, sikloklorotin, luteosikrin
<i>Penicillium patulum</i>	0.81	-	Patulin
<i>Penicillium puberulum</i>	0.81	0.83-0.90	Okratoksin A
<i>Penicillium viridicatum</i>	0.80 0.83	-	Sitrinin, okratoksin A Penisilik asit

(-)= Veri yoktur.

Substrat, fungal büyüme ve aflatoksin üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Farklı substratlar, fungal büyüme ve aflatoksin oluşumunu farklı derecelerde etkilemektedirler (Lieu ve ark., 1977; Park ve ark., 1983). Bu, küf büyümesi için uygun fakat mikotoksin sentezi için uygun olmayan, yüksek protein ve düşük karbohidratlı peynirler gibi besinlerde gösterilmiştir. Peynirler üzerinde aflatoksin üretimi hiç, az veya fazla olarak peynirin tipine göre değişen miktarlarda belirtilmiştir (Park ve ark., 1983; Zerfiridis, 1985).

Yüksek miktarlarda aflatoksin üretiminin, substratın karbohidrat içeriği ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Adye ve Mateles (1964), sakkaroz, glukoz ve fruktozun en yüksek aflatoksin üretimine neden olduğunu; laktoz, maltoz, ksiloz, sorboz, gliserol ve glutamatın büyüme desteklediklerini ama aflatoksin oluşumunun az olmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca nişasta, mannitol, sorbitol ve galaktozun iyi bir büyüme veya orta derecede aflatoksin üretimine neden olduğu da belirtilmiştir (Abdollahi ve Buchanon, 1981).

Büyüme ve aflatoksin oluşumunu etkileyen diğer bir faktör de sıcaklıktır. Mikotoksinlerin yüksek düzeyde sentezlenmeleri, küflerin optimum gelişme sıcaklıklarında veya biraz daha altında gerçekleşir. Aflatoksin üreten küfler min. 10-13°C ve max. 42°C sıcaklık isterler. Bunların optimum gelişmeleri 35-38°C olduğu halde maksimum toksin konsantrasyonuna 25-30°C lerde ulaşılır. *Penicillium* ve *Fusarium*'ların düşük sıcaklıklarda (<5°C) gelişebilmelerine karşın *Aspergillus* türleri bu sıcaklıklarda üreyemez ve toksin oluşturamaz. İçlerinden sadece *Aspergillus ochraceus* diğer *Aspergillus* türlerine oranla daha düşük sıcaklık derecelerinde okratoksin-A sentezleyebilir.

Northold ve Soentoro (1981), *Aspergillus*'ların çoğunun üremesi için optimal sıcaklığın 30-40°C olduğunu belirtmişlerdir. Northolt ve ark. (1977), bir *Aspergillus parasiticus* suşunun büyümesi ve aflatoksin üretimiyle ilgili bir çalışmada; aflatoksin B₁ üretimi için optimal sıcaklıkları, substrata bağlı olarak 24-32°C olarak saptamışlardır.

Yapılan diğer çalışmalara göre de aflatoksin üreten küflerin min. 6-8°C'lerde, max. 50-60°C'lerde üreyebildikleri halde toksin oluşumu için min. 10-13°C ve max. 42°C sıcaklık istedikleri belirtilmiştir. Ayrıca, aflatoksin üreten küflerin optimum gelişmeleri 35-38°C'de olduğu halde maksimum aflatoksin konsantrasyonuna 25-35°C'lerde ulaşıldığı saptanmıştır (Diener, U.L., 1966).

Ciegler ve Lilehoj (1968) ise; aflatoksin B'nin yüksek sıcaklıklarda daha fazla üretildiğini; aflatoksin G oranının ise inkübasyon sıcaklığı düştüğü zaman arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca aflatoksin üretimi için optimal sıcaklığın küf suşuna göre oldukça değişiklik gösterdiğini ve bunun genellikle 25-30°C' ler arasında olduğunu da belirtmişlerdir. 10°C kadar düşük bir sıcaklıkta depolamada bile toksin oluştuğu için, tarımsal ürünlerde toksin oluşumunun engellenmesinin çok zor olduğunu belirtmişlerdir.

Trucksess ve arkadaşları, (1988) da *A.flavus*'un büyümesi ve aflatoksin üretimi üzerine sıcaklık ve a_s'nin etkilerini incelemişlerdir. Sonuçta, 16°C'nin aflatoksin üretimi için çok düşük olmasına rağmen küf büyümesi olduğunu, fakat aflatoksin üretimi için sıcaklığın 26-32°C' ve a_s'nin 0.85-0.89 değerleri arasında olması gerektiğini belirtmişlerdir.

Küfler aerobik mikroorganizmalardır. Fungus sporlarının oluşumu, sporların çimlenmesi ve vejetatif üremeleri için gerekli olan oksijen miktarları oldukça değişken olabilmektedir (Deiner ve Davis, 1969). Oksijen, fungusların gelişimi için gereklidir ve mikotoksin üretimini de etkilemektedir. Örneğin, O₂ konsantrasyonu %1'den az olduğu zaman aflatoksin üretimi oldukça sınırlanmaktadır (Northolt ve Soentoro, 1981).

Aflatoksin oluşturan küflerin en yüksek düzeyde aflatoksin oluşturmaları pH: 5.0-6.0 arasında gerçekleşir. pH: 4.0'ın altındaki ortamlarda gelişip toksin oluşturabilseler de, hem misel gelişimi oldukça yavaşlar hem de toksin miktarı iyice azalır (Deiner ve Davis, 1969).

Birçok araştırmacının, başlangıç pH'sının aflatoksin üretimi üzerinde çok etkili olmadığını belirtmesine rağmen diğer bazı araştırmacılar zayıf asidik pH'nın aflatoksin üretimini artırdığını ve küf gelişimini baskıladığını göstermişlerdir (Jarvis, B., 1971).

Molina, M. ve L. Gianuzzi (2002)'nin *Aspergillus parasiticus*'un aflatoksin üretiminin, farklı pH, sıcaklık ve propiyonik asit konsantrasyonlarındaki değişimlerini konu alan araştırmasında, aflatoksin oluşumu için optimum pH'nın 27.84°C'de 5.9, 27.32°C'de ise 5.5 olduğu belirtilmiştir.

Büyüme ve mikotoksin oluşumunu sınırlayabilen diğer bir faktör de diğer mikroorganizmaların varlığıdır. *Aspergillus flavus*'un diğer küflerin varlığında daha az aflatoksin ürettiği bilinmektedir (Northolt ve Soentoro, 1981). *Aspergillus niger* grubundan bazı küflerin ve *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184 suşunun aflatoksini metabolize edebilme yeteneği gösterdiği ve toksini daha az toksik olan bileşiklere çevirebildiği bulunmuştur (Ciegler, A., Lillehoj, E.B., 1966). Weckbach ve Marth (1977), *A. parasiticus* NRRL 2999 ile birlikte büyütüldüklerinde *Rhizopus nigricans* ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin büyüme ve aflatoksin üretimini inhibe ettiğini, *Brevibacterium linens*'in ise az bir inhibisyona neden olduğunu göstermişlerdir. Wicklow ve arkadaşları (1980), sterilize edilmiş mısır taneleri üzerinde *A. flavus* ile birlikte, *Aspergillus niger* ve *Trichoderma viride* ayrı ayrı büyütüldüklerinde hiç aflatoksin üretimi olmadığını belirtmişlerdir.

A. flavus grubu türleri için bir vektör olarak rol oynayan böcekler, bu küflerin duyarlı bitki dokuları içine girmesini sağlamaktadırlar (Wilson, 1988).

Toksin oluşumu daha çok gıda maddesinin kimyasal kompozisyonuna bağlı olmaktadır. Meyve bahçelerindeki sert-olgun ve buruşmuş-olgun incirler aflatoksin oluşumu için iyi bir substrat olarak görülmektedirler (Buchanan ve ark., 1975; Morton ve ark., 1979).

2.2.2. Dış faktörler

Yer fıstığı, mısır gibi değişik bitkisel ürünlerin belirli varyeteleri; hasat zamanı, sulama ve iklime bağlı olarak *Aspergillus flavus* ve aflatoksin kontaminasyonuna daha fazla dirençli olmaktadır.

İncirlerin olgunlaşma sürecinden önce toprağın sürülmesi ile çürümüş bitkisel artıklar toprakla örtülmekte ve daha sonra toprak florası ile parçalanmaktadırlar. Bu şekilde toprak florasındaki artış, rekabet nedeni ile *A.flavus*'un gelişiminde azalmaya neden olmaktadır (Bars, 1989). İncirler olgunlaşma süreçleri sırasında, *A.flavus* ve aflatoksin birikimine karşı çok hassas oldukları için fiziksel zarara yol açacak her bir etkenden kaçınılması gerekmektedir. İkinci olarak ise meyvelerin toprak ile doğrudan teması engellenmelidir (Bars, 1989).

Kuru incirlerin kötü depolama şartları haricinde, *A.flavus* çok düşük su aktivitesi nedeni ile gelişme gösterememektedir (Bars, 1989).

2.3. Küf Sayısının Saptanmasında Kullanılan Besiyerleri

Küflerin meyvelerde gelişerek bir yandan gıdanın tüketilemeyecek bir hal almasına neden olması, diğer yandan mikotoksikozise neden olacak şekilde mikotoksinleri sentezlemeleri, bu gıdalarda bu grup mikroorganizmaların önemini ortaya koymakta ve küf sayısının gerçeğe en yakın miktarda saptanmasını sağlayacak izolasyon yönteminin belirlenmesini gerekli kılmaktadır.

Gıdalarda canlı küf-maya izolasyon ve sayımlarına etki eden pek çok faktör vardır. Bu faktörler içerisinde, kullanılan besiyerinin bileşimi önemli olanlardan bir tanesidir. Yapılan çalışmalar sonucu, küf ve maya sayımlarında kullanılan besiyerlerinden beklenen genel özellikler:

- Besiyerinin izole edilecek küfler için iyi bir izolasyon sağlaması,
- Bakteriyel gelişimi önlemesi,
- Hızlı yayılan küf kolonilerinin yayılmasını önlemesi,

- Küf ve mayalar arasında iyi bir ayırım sağlaması,
- Belirli küflerin direkt olarak tanımlanmasına yardımcı olması şeklinde özetlenebilir (Seiler, 1985; Twomey ve Mackie, 1985).

Gıdalarda maya ve küf sayımlarında üç tip besiyeri kullanılmaktadır. Bunlar genel amaçlı besiyerleri, seçici besiyerleri ve ayırt edici besiyerleridir (Hartog, 1981).

2.3.1. Genel amaçlı besiyerleri

Küf ve maya sayısının belirlenmesinde kullanılan genel amaçlı besiyerleri, küf ve maya gelişimi için ihtiyaç duyulan doğal maddeleri içermektedir. Genel amaçlı besiyerleri, maya ve/veya maya ekstraktları ve % 1.5-2 agarla katılaştırma esasına dayanarak hazırlanırlar (Hartog, 1981).

Bakteri gelişiminin önlenmesi amacıyla kullanılan maddeler:

Malt Extract Agar (MEA), Potato Dextrose Agar (PDA), Plate Count Agar (PCA) gibi genel amaçlı besiyerlerinin pH'ları, tartarik, laktik, sitrik asit gibi asitlerle düşürülmek suretiyle küf ve mayalar için seçici hale getirilirler. pH'sı düşürülmüş besiyerlerinde, sadece aside toleranslı bakteri türleri, küf ve mayaların izolasyonunu güçleştirir. Ancak bu düşük pH aynı zamanda, özellikle stres altındaki küf ve mayaların da kısmi inhibisyonuna neden olur. Nelson (1971), 10 maya kültürüyle yaptığı çalışma sonucunda, pH 3-9.5 arasındaki değerlere sahip besiyerlerinde elde edilen sayımların benzer olduğunu bildirmiştir. Ancak ısısal stres altındaki kültürlerle çalışıldığında maksimum sayı pH 8 ve yukarısında saptanmıştır. Bu araştırma stres altındaki popülasyonlarla çalışıldığında düşük pH'lı besiyerlerinin maya ve küflerin gelişimini inhibe edici etki yarattığını göstermektedir. Buna karşın bir grup araştırmacı da besiyeri pH'sının 3.5'dan 7'ye çıkarılmasıyla küf ve maya sayısının da göreceli olarak arttığını saptamışlardır. Bu nedenlerle son yıllarda gıdalarda küf ve maya sayımları için antibiyotik ilaveli nötr pH'lı besiyerlerinin kullanımı tavsiye edilmektedir (Beggerman, 1981; Beuchat, 1984; Hartog, 1981; Henson, 1981; Koburger, 1972; Seiler, 1985).

Küf ve maya izolasyonunda kullanılan besiyerlerine katılan antibiyotikler içerisinde, penisilin ve streptomisin kombinasyonu etkili bulunmakla beraber, böyle bir uygulamanın ilaçlarda yaygın olarak kullanılan bu antibiyotiklere dirençli organizmaların oluşumuna yola açabileceği düşünülmekte ve bu nedenle sakıncalı olabileceği belirtilmektedir (Seiler, 1985).

Klortetrasiklin (10-100 ppm), kloramfenikol (50-100 ppm), oksitetrasiklin (100 ppm), gentamisin (50-60 ppm), kanamisin (110 ppm), streptomisin (30-50 ppm) fungal besiyerlerinde en fazla kullanılan antibiyotiklerdendir. Ancak ısısal stabiliteleri ve geniş antibakteriyel spektrumları nedeniyle gentamisin ve kloramfenikol daha çok tercih edilirler. Bu iki antibiyotiğin, sterilizasyon öncesi besiyerine eklenebilmeleri besiyeri hazırlama açısından önemli bir kolaylık sağlar (Hartog, 1981; Seiler, 1985).

Antibiyotikler besiyerlerine tek başlarına konulabildikleri gibi kombinasyon halinde de eklenebilmektedirler. Tek başına antibiyotik kullanımında bakteriyostatik etki kaybolabilmektedir. Örneğin; klortetrasiklin, çiğ et ürünlerinden fungal izolasyonda *Enterobacteriaceae* gelişimini engelleyemezken, oksitetrasiklin de *Proteus* ve *Pseudomonas* türlerini inhibe edemez. Bu tür sorunların çözülmesi için klortetrasiklin-kloramfenikol kombinasyonlarının kullanımı önerilmektedir (Hartog, 1981; Seiler, 1985).

Küflerin besiyeri yüzeyinde yayılmasını engelleyici maddeler ve bunların kullanıldığı besiyerleri:

Gıdalardan küf ve maya izolasyonunda güçlük yaratan bir olgu da küf kolonilerinin petride besiyeri yüzeyini kaplamasıdır. *Mucor*, *Rhizopus* gibi küflerin hızlı gelişimi, daha yavaş gelişen küflerin gelişimini inhibe etmekte, dolayısıyla sayımın sağlıklı bir şekilde yapılmasını engellemektedir. Bu durumda , petrideki koloni sayısının gerçek sayıdan daha az olmasını önlemek için, hızlı yayılan küflerin gelişimini inhibe eden ve genelde koloni çapını sınırlayan maddelerin besiyerine eklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla sığır safrası (oxgall), sodyum propiyonat, pentakloronitrobenzen, gliserol ve tuz kullanılmaktaysa da son yıllarda rose bengal

ve dikloran (2,6-dichloro-4-nitroaniline) en yaygın kullanım alanı bulan maddelerdir (Hartog, 1981; Seiler, 1985).

Smith ve Dawson (1944), yaptıkları çalışmada topraktan fungus izolasyonunda rose bengalin koloni yayılmasını sınırlayıcı etkisini saptamışlardır. Rose bengalin sınırlayıcı etkisi, *Mucor*, *Rhizopus*, *Paecilomyces* gibi hızlı gelişen küflerde oldukça belirginken, daha yavaş gelişen *Penicillium* türlerinde etki daha az belirgindir (Beggerman, 1981).

Besiyerine rose bengal katılması, maya kolonilerinin boyanmasını sağladığından, sayımı kolaylaştırıcı etkiye de sahiptir. Rose bengalin inhibe edici etkisi, besiyeri ışığa maruz kaldıkça azaldığı gibi bazı küf ve maya suşları da özellikle ışık altındaki inkübasyon sırasında inhibe olmaktadır. Bu bakımdan rose bengal içeren besiyerlerinin güneş ışığından korunması yönünde önlemler alınması gerekir (Hartog, 1981; Henson, 1981).

2.3.2. Seçici ve ayırt edici fungal besiyerleri

Genel amaçlı besiyerleri esas olarak kserofilik fungusların saptanmasında yetersiz kalan besiyerleridir. Bu bakımdan kserofilik fungusların önemli oranda bulunduğu gıda grupları için, bunların izolasyonuna ve sayımına olanak veren besiyerlerinin kullanımı önemlidir (Pitt, 1974).

Kserofilik funguslar, yaklaşık 0.85'den daha düşük su aktivitesi değerlerinde üreyip gelişebilen spesifik bir fungus grubudur. Bunlar kuru ve yarı kuru gıdaları içeren düşük su aktiviteli gıda gruplarında, mikrobiyolojik kalite açısından önem arz eden mikroorganizmalardır (Pitt, 1974).

Gıdalarda kserofilik küf ve mayaların sayımı için yaklaşık 0.95 su aktiviteli besiyerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tip besiyerlerinde kserofilik olmayan funguslar da gelişebilmektedir. Sadece kserofilik fungus sayımının alınması istendiğinde su aktivitesi 0.85-0.90'a düşürülmüş besiyerlerinin kullanımı tavsiye edilmektedir (Seiler, 1985).

Ayırt edici besiyerleri bir iki taneyi geçmeyecek kadar azdır. Aflatoksijenik küfler için ayırt edici bir besiyeri olan *Aspergillus* Differential Medium (ADM) ilk kez Bothast ve Fennell (1974) tarafından formüle edilmiştir. Besiyeri içerisindeki ferrik sitrat, aflatoksijenik küflerin petri altında sarı-turuncu renk oluşturmasını sağlamaktadır ve oluşan bu renk kadmiyum sarısı veya kadmiyum sülfid rengi olarak nitelendirilmiştir.

Bothast ve Fennell (1974), 45 tane saf fungus kültürü ve mısır ve mısır unu ürünlerinden elde edilen 10 izolat kullanarak yaptıkları çalışmada tüm *A.flavus* ve *A.parasiticus* kültürlerinin ADM'de turuncu-sarı renk oluşturduklarını, bu arada *A.flavus* grupta yer alan *A.sojae*, *A.subolivaceus* ve iki *A.oryzae* izolatının; *A.ochraceus* grupta yer alan *A.sclerotiorum*, *A.sulphureus*'un ve *A.wentii* grupta yer alan *A.thomii*'nin de benzer sarı renk oluşturduklarını, ayrıca *A.ochraceus* grupta yer alan *A.auricomus* ve *A.melleus*'un da tipik olmayan ve geçici mat sarı renk oluşturduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar aflatoksijenik küflerinkine benzer renk oluşturmalarının bu besiyeri için bir dezavantaj gibi gözükse de bu türlere depolanmış hububatlar gibi bazı gıda gruplarında rastlanmamasının, özellikle bu gıdalardan izolasyonda ADM'nin kullanım alanını artırdığını belirtmişlerdir.

ADM'de koloni altında oluşan sarı-turuncu renk *A.flavus* ve *A.parasiticus* türlerince üretildiği bilinen kojik aside bağlı tutulmaktadır. Bu arada, kojik asidin bu türler yanında aynı zamanda *A.clavatus*, *A.ustus*, *A.rubrum*, *A.fumigatus*, *A.citrinum* ve *A.nidulans* tarafından da üretildiği, ancak üretilen kojik asit miktarının ADM'de sarı-turuncu renk oluşumu için yeterli olmadığı, oluşan rengin kahverengi-siyah olduğu bildirilmiştir (Hamsa ve Ayres, 1977). Diğer yandan Assante ve arkadaşları (1981), ADM'de oluşan sarı-turuncu renge aflatoksijenik küfler tarafından üretildiği bilinen aspergillik asit veya neoaspergillik asidin neden olduğunu belirtmişlerdir.

ADM'de sarı-turuncu renk oluşumunu sağlayan ferrik sitrat, besiyerine konulmadığında veya ferrik sitrat yerine mangan sülfat, çinko sülfat veya bakır sülfat konulduğunda sarı-turuncu pigmentasyonun gözlenmediği, ferrik sitrat yerine ferrik klorid konulduğunda ise pigment üretiminin aynı fakat *A.flavus* gelişiminin daha

yavaş olduğu saptanmıştır. Ferrik sitrat miktarı 0.5 g/lt olduğunda pigmentasyon rengi sarı-turuncu iken, miktar 2g/lt'ye çıkarıldığında, renk turuncu-kırmızıya dönmektedir (Hamsa ve Ayres, 1977).

ADM besiyeri, *A.flavus* ve *A.parasiticus* türlerini direkt olarak ayırt etmesi ve sayımı kolaylaştırması nedeniyle, herhangi bir mikolojik işlem uygulanmaksızın bu grup fungusların tanımlanmasında direkt olarak kullanılabilecek uygun bir besiyeri olarak önerilmektedir (Bothast ve Fennell, 1974). Ancak ADM kullanımının, hızlı gelişen bazı küf türlerine karşı seçici olmaması sonucu sınırlı olması nedeniyle Hamsa ve Ayres (1977), 10 ppm dikloran ve 50 ppm streptomisin sülfat eklenmiş ADM'yi (MADM) pamuk çekirdeğinden *A.flavus* izolasyonunda kullanmıştır. Bu yeni besiyeri *A.flavus*'un sarı-turuncu pigment üretimine zarar vermemiş, diğer fungusların radyal gelişiminde çeşitli derecelerde inhibisyona neden olmuştur. Genelde *Rhizopus sp.*'nin petride hızlı gelişimi ile misel yığınları altında kalan diğer küflerin gelişimini engellemesi ADM'ye dikloran eklenmesi ile önlenmiştir. 25 ppm'in üzerindeki konsantrasyonlar *A.flavus* kültürlerinin gelişimini inhibe etmektedir. 50 ppm streptomisin sülfat ilavesi ise bakteriyel gelişimi engellemede yeterli gelmiş, *A.flavus* gelişimini ve pigment oluşumunu ise etkilememiştir.

Pitt ve arkadaşları (1983) tarafından formüle edilen ve ADM'den farklı olarak ferrik amonyum sitrat ve kloramfenikol içeren ve dikloran ilaveli *Aspergillus Flavus Parasiticus Agar*'da (AFPA), *A.flavus* ve *A.parasiticus* kolonilerinin petri altında ADM'den daha iyi turuncu-sarı renk oluşturdıkları bildirilmiştir. Beuchat (1984), işlenmemiş yer fıstığı, mısır unu ve bir çeşit fasulye örneklerinden AFPA ve ADM'ye yaptığı yayma plaka ekimlerde inkübasyon sonunda, yer fıstığı örnekleri için ADM'de 30°C'de 42-44 saat inkübasyonda elde edilen toplam maya-küf sayısının, AFPA'da 37°C'de 70-72 saat inkübasyonda elde edilen sayımlardan daha az olduğunu; mısır unu ve bir çeşit fasulye örneklerinde ise ADM ve AFPA arasında herhangi bir fark elde edilmediğini, ancak 30°C'de elde edilen sayımlardan daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Dikloran içeren ADM'nin pH'sı ile *A.flavus* kültürlerinin pigment üretimi arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, pH 3.5'a düşürüldüğünde veya 9.5'a çıkarıldığına karakteristik turuncu-sarı rengin açık sarıya döndüğü, bu arada sporulasyonun pH'nın 6.5'dan 5.5, 4.5, 3.5 değerlerine düşürülmesiyle arttığı saptanmıştır. Pigmentasyona sıcaklığın etkisi araştırıldığında pigmentasyonun, 25°C, 30°C, 32°C ve 37°C'lerde değişmediği, ancak 45°C'de pigment üretiminin olmadığı, bu arada 25°C'de canlı sarı-turuncu pigment ürettiği bildirilen *A.oryzae*'nin test edilen suşunun artan inkübasyon sıcaklığıyla pigment yoğunluğunun azaldığı ve 37°C'de hiç pigment üretmediği saptanmıştır (Hamsa ve Ayres, 1977).

Aspergillus flavus grubundaki fungus kolonilerinin aflatoksin üretme yeteneklerini belirlemek amacıyla bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla, sıvı ve katı ortamların doğal veya semisentetik substratlar olarak kullanıldığı bazı yöntemler uygulanmıştır (Hara ve ark., 1974). Bu yöntemlerin kullanımı sırasında, besiyerinin ekstraksiyonu ve kromatografik tekniklerle analizi, aflatoksin varlığının kanıtlanması için gerekli olmuştur. Çok sayıda izolatin farklı substratlar üzerinde test edilmesi pahalı ve zaman alıcı bir işlem olmuştur. Bu yüzden, aflatoksin üretiminin direkt olarak görünür kılınması amacıyla bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde çeşitli tuzlar (Adye ve Mateles, 1964; De Vogel ve ark., 1965; Torrey ve Marth, 1976), veya corn step liquor (Hara ve ark., 1974) ve hindistan cevizi (Lin ve Dianese, 1976; Davis ve ark., 1987; Lemke ve ark., 1988, 1989; Dyer ve McCammon, 1994) gibi aflatoksin üretimini artırıcı katkı maddelerini içeren kültür ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlarda geliştirilen aflatoksijenik funguslar, koloni etrafında bej bir halka oluşturmaktadırlar. Bu bej halka, UV ışığı altında mavi floresan vermektedir (Ordaz ve ark., 2003).

2.4. Kuru İncirlerde Küf Floraları Üzerine Yapılan Araştırmalar

Ülkemizde bazı tarımsal ürün ve işlenmiş gıda maddelerinin küf floraları üzerinde birçok araştırma yapılmış olmasına karşın, incirler üzerinde bu konuda yapılan çalışma oldukça az sayıdadır.

Çakmakçı ve Kösker adlı araştırmacılar 1973 yılında Ankara piyasalarından toplanan 8 kuru incir örneğinde sırası ile, 70, 110, 380, 153, 157, 76 ve 21 adet/g maya ve küf sayıldığını bildirmişlerdir. Amerika Gıda ve İlaç Örgütü (FDA) tarafından 1973-1974 yıllarında incelenen 168 kuru incir örneğinin hiçbirisinde gözle görünür şekilde küf bulunmadığı ve örneklerden daha çok *Aspergillus niger*, *Rhizopus* türleri, bazı *Pullularia* türleri ve nadiren *Aspergillus flavus* grubu küflerin izole edildiği bildirilmiştir. Ayrıca 1977 yılında İzmir ve Aydın yöresindeki çeşitli incir işletmeleri ve bahçeleri ile Tariş merkez depoları ve bu kuruma bağlı bazı ortak kooperatiflerden sağlanan 56 tane kuru incir ve ezmeleri üzerinde küf sayımı ile bunların izolasyon ve tanıları yapılmıştır. Toplam olarak 138 küf izole edilmiştir. Bu izolatlardan büyük çoğunluğunun *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarına ait olduğu saptanmıştır. Bunların dışında *Cladosporium*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Chaetomium*, *Geotrichum* ve *Mucor* genuslarına ait türler de izole edilmiştir (Aşkın ve ark., 1977a).

1986 yılında Ege Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada ise 206 tane sergi ve 78 tane depo örneği olmak üzere toplam 284 kuru incir örneğinde mikroflora saptanmıştır (Karapınar ve ark., 1989). 206 sergi örneğinin 47'sinden *A.flavus* izole edilirken, bu örneklerin hiçbirisinde *Aspergillus parasiticus*'a rastlanmamıştır. Depo örneklerinde ise 10 farklı küf türü izole edilmiştir ve yine *Aspergillus niger* türü dominant olmuş ve sergi örneklerinde saptanamayan *A.parasiticus* ile *Mucor rasemosus* küf türleri izole edilmiştir. Depo örneklerinin %5'inden *A.flavus* izole edilmiştir (Karapınar ve ark., 1989).

Diğer bir çalışmada ise incelenen 30 örnekten elde edilen izolatlarda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Fusarium* olmak üzere 4 küf genusu saptanmıştır (Kocabaş, 1991).

2.5. Kuru İncirlerde Aflatoksin Üzerine Yapılan Araştırmalar

İncirlerde aflatoksin sorunu ilk kez 1973 yılında, Ekim 1972'de Avrupa ülkelerine ihraç edilen kuru incirlerde, Danimarka'da yapılan analizler sonucu 938 ppb aflatoksin B₁ saptanmasıyla ortaya çıkmıştır (Anon, 1990).

1973-1974 yıllarında ABD'de, Türkiye'den gönderilen 38 parti kuru incirden 3 partide aflatoksin bulunduğu belirlenmiş ve aflatoksin içeren kuru incirler ülkemize geri gönderilmiştir (Anon, 1990). Ancak bu yıllardan 1985 yılına kadar incir dış satımında aflatoksin ile ilgili önemli bir darboğaz yaşanmamıştır (Anon, 1990).

A.flavus ile aşılanan kuru incirlerde Aşkın ve arkadaşlarının (1977b) yaptığı bir çalışmada, örneklerin yarısı nemlendirilip sterilize edilmiş, diğer yarısı ise nemlendirilme veya sterilizasyon işlemlerinden herhangi birine tabi tutulmamışlardır. Bu çalışmalarda, aflatoksin oluşumu, inkübasyonun ikinci gününden itibaren başlamış, 4-6 gün içinde maksimuma ulaşmış, bundan sonra ortamda aflatoksin miktarında bir azalma görülmüştür. Nemlendirme ve sterilizasyon işlemlerinin uygulanmadığı kuru incirlerde ise, inkübasyonun sonuna kadar bir küf gelişimi ve aflatoksin oluşumu olmamıştır.

Morton ve arkadaşlarının (1979), kuru incir, kuru kayısı, kuru üzüm ve ananas üzerinde çalışarak bu meyvelerin aflatoksin oluşturma potansiyellerini inceledikleri çalışmalarında, *A.flavus* ATCC 15548, *A.flavus* NRRL 3251 ve *A.parasiticus* NRRL 2999 olmak üzere 3 aflatoksijenik suş kullanılmıştır. Tüm meyveler aflatoksin oluşturabilen küfler ile aşılansak analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada kuru incirler, aflatoksin oluşturma potansiyeli açısından, kayısıdan sonra ikinci sırayı almıştır (Morton ve ark., 1979).

1986 yılında özellikle İsviçre'de Basel-Landschaft Kanton bölgesinde incelenen ithal Türk incirlerinde 14 örnekte ortalama 4µg/kg aflatoksin B₁ ve aflatoksin G₁ bulunduğu; İsviçre'de yapılan analizler sonucunda, 83 Türk inciri örneğinin %17'sinin aflatoksin ile kontamine olduğu bulunmuş ve özellikle 1986

yılının ürünlerinin alımlarında ithalatçı firmaların dikkatli olmaları konusunda uyarılar getirilmiştir. İsviçre'ye ihraç edilen 1985 yılı mahsulü Türk incirlerinde tek meyvede 5µg/kg aflatoksin B₁ bulunduğu ve toplam partide ortalama 13.0 µg/kg aflatoksin B₁ ve 15.2 µg/kg G₁ bulunduğu bildirilmiştir. Tanelerin yüzeyinde ultraviyole ışığı altında gözlenen parlak sarı-yeşil floresansın, aflatoksin kontaminasyonu ile kalitatif olarak çok yüksek oranda ilişkili olduğu açıklanmıştır (Karapınar, 1989).

Ege Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada, 206 tane sergi ve 78 tane depo örneği olmak üzere 1986 yıl ürünü toplam 284 kuru incir örneğinde aflatoksin kantitatif analizleri yapılmıştır. İncelenen depo örneklerinin hiçbirisinde aflatoksin saptanmamış, sadece 8 hurda tipi sergi örneğinde aflatoksin B₁, B₂ ve G₁ bulunmuştur. Sergi örneklerinin sadece %4'ünde aflatoksin kontaminasyonu saptanmış olmakla beraber aflatoksin düzeylerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (Karapınar ve ark., 1989).

1991 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise, 30 kuru incir örneğinden 10 tanesinde aflatoksijenik küf türleri olan *A.flavus* ve *A.parasiticus* saptanmıştır (Kocabaş, 1991).

2.6. Ultraviyole ve Gamma Işınlmasının, Funguslar ve Aflatoksinler Üzerine Etkilerinin İncelendiği Çalışmalar

İyonize radyasyonunun, mikotoksin üretimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar genelde aflatoksin ve okratoksin üzerinde yoğunlaşmıştır (Aziz, 1990; Aziz, 1997).

Fungusların gamma ışınlamasına karşı hassas olduğu, Saleh ve Abd El-Aal ve Aziz tarafından, 1996 yılında gösterilmiştir. Küflerin, gamma ışınlarına karşı çok hassas olduğu ve mikotoksin üretiminin, gıdaların ışınlanmasından sonra azaldığını işaret eden pek çok yayın bulunmaktadır (Refai ve ark., 1996; Youssef, Mahrous, ve Aziz, 1999). Fakat bu yayınlara karşıt görüşte olan ve laboratuvar koşulları altında ışınlamadan sonra, mikotoksinlerin azaldığını (Aziz ve ark., 1990), arttığını (Paster,

Barkai-Golan, ve Padova, 1985) veya değişmediğini (Paster ve Bullerman, 1988) belirten yayınlar da bulunmaktadır. Bu çelişki, küf gelişimini ve toksin oluşumunu; fungal suşun, depolama koşullarının ve nemin ve ışınlama dozunun etkilediğini göstermektedir (Mitchell, 1988).

Aziz ve arkadaşlarının (2002c) yaptığı bir çalışmada gamma radyasyonunun, mikotoksin üreten küfler ve meyvelerdeki mikotoksinler üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, toplam 100 meyve örneği (10'ar tane çilek, kayısı, şeftali, üzüm, incir, elma, dut, erik, armut ve hurma) Mısır'ın Cairo ve Giza bölgelerindeki marketlerden alınmıştır. Meyve örneklerinin ışınlaması, oda sıcaklığında, 1.5, 3.5, ve 5.0 kGy düzeylerinde yapılmıştır. Fungal koloni oluşturan birimler, seri dilüsyonlar yapılarak ve örneklerin Potato Dextrose Agar'a iki tekrarlı şekilde ekilmesi ile belirlenmiştir. Aynı işlemler, gamma ışını ile ışınlanmamış meyve örnekleri ile de tekrarlanmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler sayılmış ve 1 gram örnekteki koloni oluşturan birim sayısı, gamma ışını ile ışınlanmış ve ışınlanmamış meyve örnekleri için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Ayrıca her bir ışınlanmış ve ışınlanmamış meyve örneği, HPLC kullanılarak mikotoksin içerikleri yönünden analiz edilmiştir. Bu çalışmada, 1.5 ve 3.5 kGy dozla ışınlanan meyve örneklerinde toplam fungal sayının azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, farklı meyve örneklerinin fungal floralarının, gamma ışınlarına karşı hassas olduğunu ve 5.0 kGy dozunda tamamen inhibe olduklarını göstermiştir.

Aziz ve arkadaşlarının (2002a) yaptığı diğer bir çalışmada ise yine gamma ışınlamasının, mısırlardaki *Aspergillus flavus* tarafından üretilen aflatoksin B₁ üzerine olan etkileri incelenmiştir. Işınlama dozlarının artırılması ile mısırdaki toplam canlı *A.flavus* sayısı azalmış ve fungus, 3.0 kGy dozunda tamamen inhibe olmuştur. Aflatoksin B₁'in miktarı ise, 1.0 ve 1.5 kGy dozlarda artmış ve 3.0 kGy gamma ışınlamasından sonra, 45 gün depolamadan sonra bile, aflatoksin üretimi olmamıştır. Sonuç olarak, *A.flavus*'un gelişmesi, ışınlama dozu, depolama koşulları ve substrat kompozisyonunun aflatoksin B₁ üretiminde önemli rol oynadığı ortaya çıkmıştır.

Yine Aziz ve arkadaşları (2002b) tarafından yapılan, gıda örneklerinden izole edilen nontoksijenik küflerin, mikotoksin sentezlemelerine, UV radyasyonunun etkilerinin incelendiği bir çalışmada, UV radyasyonunun, mikotoksin üretme yeteneğine sahip olmayan küfler üzerine mutajenik etki yaparak mikotoksin üretme yeteneği kazanmalarına neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. 30', 60', 120', 180' ve 210' UV ışınına maruz bırakılan küflerin mikotoksin üretme yetenekleri incelenmiştir. Bu incelemeye göre; mikotoksin üretmeyen küfler, 30 ve 60 dakika UV'ye maruz bırakıldıklarında da aynı özelliklerini korumuşlardır. 120 dakikadan sonra ise bu küflerin mikotoksin üretme kapasiteleri oluşmuş ve UV'ye maruz kalma süreleri arttıkça, mikotoksin üretme yetenekleri de belirgin bir şekilde artmıştır.

Zeinab ve arkadaşları (2001) tarafından *Nigella sativa* tohumları üzerinde yapılan bir çalışmada, gamma radyasyonunun toplam canlı fungal yükün ve mikotoksin üretiminin üzerindeki etkileri incelenmiştir. Buna göre; tohum örneklerinin, 0.25'den 6 kGy'e kadar değişen dozlarda radyasyona maruz bırakılması sonucunda, tohumların fungal yükü, radyasyon dozu arttıkça azalmıştır. Aynı zamanda 2.5 kGy'den daha fazla dozlarda ışınlanan tohum örneklerinden izole edilen fungusların mikotoksin üretme kapasitelerinin de oldukça azaldığı gözlenmiştir. Fakat 0.75 kGy miktardaki dozun total aflatoksini artırdığı bulunmuştur. Schindler ve arkadaşları (1980), bu artışı fungal mutasyonlara bağlı olduğunu bildirmiştir. Aflatoksin üretimi, 1.0 kGy'lik dozda maksimum düzeyine ulaşmıştır. 3.0 kGy'de ise aflatoksin gözlenmemiştir. Aynı çalışmada, *A.flavus*'un işlem görmüş ve görmemiş sporlarının germinasyonu, gamma radyasyonunun etkilerinin belirlenmesi amacıyla ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Gamma ışınlanmasının, spor germinasyonunu inhibe ettiği ve kuru miselyal ağırlığı azalttığı görülmüştür.

Fargues ve arkadaşlarının 1996 tarihinde yaptığı çalışmada, fungusların konidiumları, 0, 1, 2, 4 ve 8 saat doğal güneş ışığına bırakılmıştır. Bu çalışma sonucunda, 2 saat ve daha fazla süreler güneş ışığına maruz bırakılmanın, tüm izolatlar için zararlı olduğu bulunmuştur.

Altuğ ve Yousef (1990) tarafından yapılan bir çalışmada ise incirlerdeki AFB₁'in sodyum bisülfid, sıcaklık ve UV etkenlerinin kombinasyonları ile degradasyonu araştırılmıştır. Buna göre bisülfid, bisülfid + hidrojen peroksit (H₂O₂) ve UV işlemlerinde sırası ile; %68.4, %65.5 ve %45.7 degradasyon sağlanmıştır.

Bazı aflatoksinler, çevresel koşullar uygun olduğunda ultraviyole radyasyonu uygulaması ile degrade edilebilirler. Bunun uzun yıllardır bilinmesine rağmen sütteki AFM₁'in UV enerjisi ile detoksifikasyonu 1985'den önce yapılmamıştır. Yousef ve Marth (1985) tarafından yapılan bir çalışmada; 10, 30 ve 60 dakika ışınlanan AFM₁'li sütlerin HPLC ile aflatoksin analizleri yapılmıştır. Buna göre; 10, 30 ve 60 dakika UV ile ışınlanan sütlerde sırası ile, %42, %65 ve %100 AFM₁ degradasyonu sağlanmıştır. Aynı deneme bir de, lambadan süte yansıyan sıcaklık, soğuk su geçen bir düzenekle sabit tutularak yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ise, 10,30 ve 60 dakikalar için sırasıyla, %23.5, %36.6 ve %51.1 olmuştur. Üçüncü bir denemede ise AFM₁ ile kontamine edilmiş süt, 10 dakika UV ile ışınlama, hidrojen peroksit (H₂O₂) ile işleme sokulma ve hem UV hem de H₂O₂ ile işleme sokma olmak üzere 3 farklı aşamadan geçirilmiştir. Bu denemeden elde edilen sonuçlar ise sırasıyla; %56, ihmal edilebilir ve %100 olmuştur. Bu çalışmadan çıkan genel sonuçlar; ultraviyole enerjisinin sütteki AFM₁'i degrade ettiği, degradasyon oranının UV enerjisine maruz kalma süresine bağlı olduğu ve UV'nin etkisinin, sütte H₂O₂ bulunması ile arttığı olarak belirlenmiştir.

Levitin ve arkadaşlarının (1971) yaptığı bir çalışmada ise, konidiumların canlılığı ve büyüme yeteneği, UV'ye maruz kalma süresi ile ters orantılı olarak değişim göstermiştir.

Müller-Kögler (1965), fungus konidiumlarının 60 dakikadan fazla UV ışınına maruz bırakılması sonucu zarar görmediğini, 1.5 saat gibi daha uzun sürelerden sonra fungusun daha hızlı gelişmeye başladığını ve daha iyi spor ürettiğini belirtmiştir. 4.5 saat sonra ise fungusun fruktifikasyonunun azaldığını ve 30-48 saat sonra ise durduğunu belirtmiştir.

2.7. Aflatoksinlerin Detoksifikasyonu

Aflatoksinle kontamine gıdaların detoksifikasyonu için akla gelebilecek her yöntem denenmiştir. Aflatoksin, gıdalar içinde çok stabildir ve termoresistanz özelliğinden dolayı pastörizasyon, buharda pişirme, fırında pişirme ve hatta sterilizasyon yöntemleri ile toksinin parçalanması olanaklı değildir.

Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde öncelikle hammaddenin tarlada gelişimi, hasatı, depolanması, nakliyesi, ürüne işlenmesi ve ürün elde edilmesi aşamalarındaki küf kontaminasyonunun engellenmesi veya en aza indirilmesi önem taşımaktadır. Mikrobiyal kontaminasyonu kontrol altında tutmak çok güçtür. Mikrobiyal kontaminasyon ancak ürünün hasatı ve onu izleyen aşamalarda alınacak hijyen ve sanitasyon önlemleri ve bilinçli uygulamalarla büyük ölçüde engellenebilir. Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde ikinci ve daha önemli adım ise hammadde, ara ürünler ve son ürüne çeşitli şekillerde bulaşan küflerin gelişiminin önlenmesidir. Bu da üretimde iyi bir teknolojinin kullanılmasıyla mümkün olabilir. Ancak küflerin gelişme isteklerinin az olması ve buna bağlı olarak hemen her yerde ve her koşulda üremeleri nedeniyle, mikotoksin oluşumunun önlenmesinde büyük güçlükler yaşanmakta ve çoğu kez başarısız olunmaktadır. Aflatoksin kontaminasyonunun önlenemediği durumlarda üründen aflatoksin uzaklaştırılması ve detoksifikasyon amacıyla çok sayıda araştırma yapılmakta ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik pek çok yöntem denenmektedir (Goldblatt, 1977; Tunail, 1990).

Fiziksel ayırma yöntemleri arasında, elle veya elektronik yollarla ayıklamadan, aflatoksin düzeylerini azaltmak amacıyla yaygın olarak yararlanılmaktadır. Rengi değişmiş, bozulmuş, şekli bozuk taneleri ayıklayarak aflatoksini azaltma yönünde en iyi sonuçlar yer fıstığı sektöründe alınmıştır. Mısır veya pamuk tohumu gibi ürünlerde ise bu yöntemi uygulamada güçlüklerle karşılaşıldığından sıklıkla kullanılmamaktadır. Ürünler bir küf bozulması göstermediği halde mikotoksinleri önemli ölçüde içerebilmektedir. Bu yüzden ayıklama ile son üründe başlangıçtan düşük aflatoksin düzeylerine ulaşılsa bile, çoğu kez kontaminasyonun tamamı giderilememektedir. Küflerin geliştiği tanelerin

yoğunluğunun sağlam tanelere göre daha az olmasından yararlanılarak aflatoksinin azaltılması ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Fiziksel dekontaminasyon yöntemleri arasında, iyonize olan ve olmayan ışınların, solvent ekstraksiyonlarının, adsorbsiyon ve mikrodalga ile ısıtma işleminin aflatoksin üzerine etkileri incelenmektedir (Goldblatt, 1977; Rustom, 1997).

Aflatoksinin kimyasal yapısında bulunan lakton bağı onları alkalilere duyarlı kılar. Ayrıca oksidan maddelere karşı da aflatoksin stabilitesini koruyamaz. Pek çok kimyasal madde aflatoksinin inaktivasyonunu sağlar. İçlerinde en etkili olanları; amonyak, klor gazı, hidrojen peroksit, sodyum hipoklorit ve ozondur. Bu maddelerin kullanılması ile detoksifikasyon sağlanabilirse de gıdalarda ve yemlerde istenmeyen değişiklikler meydana geldiğinden veya bazı maddelerin besin değeri azaldığından, özellikle gıda sektöründe kullanılmaları olanaklı değildir (Bata, 1999).

Conzane (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, yer fıstıklarındaki aflatoksin içeriğinin bazı kimyasal ajanlarla laboratuvar koşulları altında indirgenme olasılığı araştırılmıştır. Aflatoksinin azaltılması, asit koşullar altında, %10 H₂O₂ solüsyonu ile kaynayan su banyosunda 60 dakika bekletilerek yapılmıştır. Daha sonra HPLC ve TLC ile aflatoksinler analiz edilmiştir ve bu yöntemin aflatoksinlerin uzaklaştırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Bu işlemler sırasında yer fıstığının özellikleri dekontaminasyon metodundan etkilenmemiştir.

Sıvı gıdalardan AFB₁' in uzaklaştırılmasında denenen bentonit ile adsorbsiyon yöntemi veya aflatoksinin parçalanmasını sağlayan UV veya iyonize ışınlarla ışınlama yöntemleri ile de aflatoksinin tamamına yakın kısmının detoksifikasyonu sağlanır. Ancak bentonit çok az gıdaya uygulanabilir olduğundan fazlaca ilgi çekmemiştir (Bata, 1990).

Gıda katkıları ve kimyasal absorbanlar da, potansiyel dekontaminasyon yöntemleri olarak dikkate alınmaktadır. Tabata ve arkadaşları (1994), çok sayıda gıda katkı maddesini bu yönden incelemiş ve bazılarının aflatoksin düzeyini azalttığını gözlemiştir. Diğer taraftan, patulin ve okratoksin A'nın aktif karbonla giderilmesinde başarılı sonuçlar alınmıştır (Mutlu, 1998; Galvano, 1998). Fiziksel ve

kimyasal detoksifikasyon yöntemlerinin birlikte kullanıldığı çalışmalar da yapılmaktadır (Altuğ, 1990; İçibal, 1992). Kimyasal dekontaminasyon işlemleri içerisinde amonyaklama işlemi bazı ülkelerde yasal olarak kabul görmüştür ve bu ülkelerde yem hammaddelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bata, 1999).

Biyolojik yöntemlerden üzerinde en çok çalışılanlardan biri mikotoksinin fermentasyon yoluyla giderilmesidir. İki farklı çalışmada, zeralenon ve fumonisinle kontamine olmuş mısırlardan etanol eldesi sırasında toksin miktarındaki değişim izlenmiş; her ikisinde de üretilen etanolde toksin bulunmazken, toksinin diğer fraksiyonlarda kaldığı belirlenmiştir (Bothast, 1992). Alkol fermentasyonunun, trikotesenler üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada da, trikotesenlerin kendi türevleri olan maddelere dönüştüğü görülmüştür (Bata, 1990). Bir başka çalışmada da, bira üretiminde alkol fermentasyonu sırasında, 3 *Saccharomyces cerevisiae* suşunun malttaki okratoksin-A, fumonisin B₁ ve B₂'yi azalttığı görülmüştür (Bennett, 1996).

Bazı mikroorganizmalar aflatoksinin metabolize edebilme yeteneği gösterirler ve toksini daha az toksik bileşiklere çevirirler. Sayıları çok sınırlı olan bu mikroorganizmalar içinde sadece *A.niger* grubundan bazı küfler yer alır. Bu küfler toksik olan AFB₁ ve AFG₁' i, çok daha az toksik olan AFB_{2a} ve AFG_{2a} derivatlarına çevirebilirler. Bakterilerden de *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184 suşu, test edilen yaklaşık 1000 mikroorganizma içinde aflatoksinin adsorbsiyon yolu ile elemine eden tek bakteridir. Bu bakteri kullanılarak süt, yer fıstığı yağı, yer fıstığı, tahıllar 20°C'de 12 saat inkübasyon sonunda detoksifiye edilmiştir (Ciegler, 1966). Bakterinin adsorbe ettiği toksin, hücrelerin ölmesi ile tekrar hiçbir değişikliğe uğramadan ortama salındığından ve uygulamanın getirdiği başka zorluklar nedeniyle biyolojik detoksifikasyon yöntemi günümüzde kullanılmamaktadır.

Denenen çok çeşitli, özellikle de kimyasal yöntemlerle istenilen sonuçlara ulaşılamaması, fiziksel yöntemlerden seleksiyona ağırlık verilmesine neden olmuştur. İşlevsel ve kolay uygulanabilir olan bu yöntem ne yazık ki sadece bazı taneli tarım ürünleri için uygundur. Tanelere bulaşan küfler burada gelişerek renk

değişimine neden olduklarından bunların elle seleksiyonu olanaklıdır. Özellikle UV lambaları altında floresan veren antep fıstığı, fındık ve incirlerin otomatik aletlerde ayrımı ile, ürünlerdeki aflatoksin içeriği % 50' ye varan oranlarda azaltılabilmektedir.

2.8. Mikotoksinlerin Analizinde Kullanılan Genel Yöntemler

Örnekleme, analiz işleminin oldukça önemli bir kısmıdır. Örnekleme işleminin amacı, partiyi temsil edecek olan bir laboratuvar örneği elde etmektir.

Bir mikotoksin örnekleme planı; mikotoksin test prosedürü (örnek alımı, örnek hazırlama yöntemi ve analitik yöntemler) ve mikotoksinin kabul/red sınırları ile belirlenir. Bir mikotoksin test prosedüründe, toksin homojen dağılmadığı için, partinin mikotoksin konsantrasyonu %100 doğrulukla belirlenemez. Yani bazı temiz partiler, örnekleme planı sonucunda reddedilebilir veya bazı kirli partiler ise kabul edilebilir bulunabilir. Bu risklerin büyüklüğü, mikotoksin test prosedürü sırasındaki çeşitliliğin büyüklüğü ile ilişkilidir (Whitaker, Thomas B., 2003).

Test prosedürü;

Bir mikotoksin test prosedürü 3 basamaktan oluşur.

- a) Örnek alma basamağı; bir parti içerisinde, belirli büyüklükte örneklerin seçilmesini içerir.
- b) Örnek hazırlama basamağı; 2 basamaklı bir sistemdir.
 - Örneğin öğütülmesi
 - Alt örneklerin hazırlanması
- c) Analitik basamak; alt örneklerden mikotoksinin solvent ekstraksiyonu, solventin saflaştırılması ve solventteki mikotoksinin kantitatif analizinin yapılması gibi basamaklardan oluşur. Analitik basamakta ölçülen mikotoksin değeri daha sonra, partideki konsantrasyonu belirlemek ve partinin kabul edilebilir mikotoksin sınırları içinde mikotoksin içerip içermediğini bulmak için kullanılır (Whitaker, Thomas B., 2003).

Test prosedürü uygulanırken, partideki mikotoksin konsantrasyonunu belirlemek için çok küçük bir miktar kullanılır. Örneğin kütlesi, test prosedürünün her basamağında devamlı olarak azalır. Örnek olarak; 25000 kg'lık bir partiden 25 kg örnek alınırsa, örnek alma basamağında, miktar 1000 kez azaltılmış olur. Alınan 25

kg örnek parçalanır ve bundan 250 g alt örnek alınıp mikotoksin miktarı için analiz edildiğinde ise miktar 100 000 kez azaltılmış olur. Sonuçta mikotoksin miktarı, solvent karışımı içindeki yaklaşık 1 g ürünle belirlenir. Bu örnekte, 25 000 000 g'lık partinin sadece 1 g'ı mikotoksin miktarının belirlenmesi için kullanılır. Sonuç olarak; aflatoksin gibi bir mikotoksin, ürünün 1 g'ındaki nanogram (ng) cinsinden aflatoksin olarak belirtilir (ürünün 1 gramındaki aflatoksinin 1 nanogramı 1ppb'dir.) (Whitaker, Thomas B., 2003).

Mikotoksinlerin analizindeki diğer bir basamak, test edilen materyalin ekstraksiyonudur. Genel olarak mikotoksinler; kloroform, diklorometan, asetonitril, etil asetat, aseton ve metanol gibi organik çözücü ile ekstrakte edilmektedirler. Ayrıca bu çözümlerle birlikte az miktarda su ve asitler de kullanılır. Mikotoksinler çok düşük miktarlarda bulunduklarından, ekstraktın yoğun bir konsantrasyonda elde edilmesi gerekmektedir. Ayrıca temizleme işlemi de yapılmalıdır. Temizleme işlemleri, silica gel, alüminyum oksit, poliamid, florisil ve sephodex gibi maddeler ile kolon kromatografisi ile yapılabildiği gibi, ayırma hunilerinde de sıvı ekstraksiyonu yapılmaktadır. Toksinlerin çoğu lipofilik olmadığı için, yağlar bu şekilde toksinsiz olarak uzaklaştırılırken, ekstrakte edilen toksinin de büyük bir çoğunluğu uzaklaştırılmış olur. Bu kısım konsantre edildikten sonra ise "final ekstrakt" elde edilmiş olur (Egmond, 1981).

Elde edilen final ekstraktta, mikotoksin tayinine engel olabilecek bazı maddeler bulunabilir. Bu nedenle mikotoksini ayırmak için çeşitli kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan ilki 1 ve 2 yönlü ince tabaka kromatografisi (TLC)'dir (Egmond, 1981). Mikotoksin analizinde son yıllarda sıkça kullanılan ve en güvenilir mikotoksin analiz yöntemi olarak kabul edilen, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), özellikle gıdalarda bulunan toksinlerin ayrılmasında iyi bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Whitaker, Thomas B., 2003).

Bir mikotoksin test prosedüründeki hataların kaynaklarının anlaşılması ile hatalar etkin bir biçimde azaltılabilir. Örnekleme basamağı, parti içindeki mikotoksin dağılımından dolayı en çok hata kaynağı olan kısımdır. Örneğin; örnek alma (5 kg),

örnek hazırlama (250 g alt örnek) ve analiz (TLC) sıra ile %83, %9 ve %8 total aflatoksin test hatası vermektedir. Örnek miktarı arttıkça örnekleme hatası azalmaktadır. Ayrıca daha fazla miktarda alt örneklerin kullanılması da örnek hazırlama sırasındaki hatayı azaltmaktadır. Son olarak da analiz edilen sıvı miktarını (veya örnek sayısını) artırmak ve HPLC ve TLC gibi güvenilir yöntemlerin kullanılması analitik hatayı en aza indirmektedir (Whitaker, Thomas B., 2003).

Test prosedürünün hata payının azaltılması için yapılması gerekenler;

- Örnek sayısının ve büyüklüğünün artırılması.
- Alt örnek sayısının ve büyüklüğünün artırılması.
- Örneklerin daha küçük parçalara ayrılması.
- Ekstrakt üzerinde yapılan ölçümlerin sayısının artırılması.
- Analitik yöntemlerde ileri teknolojinin (HPLC, TLC) kullanılması.



3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kuru incir örnekleri

Bu araştırmada, Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarı'na yöredeki incir işletmelerinden gelen kuru incir ezme örnekleri ve Nazilli, Aydın ve İncirliova pazarlarında alınan 2003-2004 yılı kuru incir örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kuru incir örneklerinin alınmasında Gıdalar İçin Mikrobiyolojik Spesifikasyonlar Uluslararası Komisyonu'nun (International Commission of Microbiological Specifications for Foods, ICMSF, 1978) önerdiği örnekleme planı dikkate alınmıştır. 2x500'er gramlık kuru incir örneklerinden toplam 50 örnek çalışılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Besiyeri 1:

<i>Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBCA) (Oxoid, CM549)</i>	
Mikolojik pepton	5.0 g
Glukoz	10.0 g
Di-potasyum fosfat	1.0 g
Magnezyum sülfat	0.5 g
Rose-Bengal	0.05 g
Agar	15.5 g
Son pH	7.2±0.2

16 gram hazır besiyeri, 500 ml distile suda ısıtarak çözölmüş ve 3 ml etil alkolde çözölmüş 1 vial chloramphenicol selective supplement eklenmiştir. 121°C'de 5 dakika otoklavda steril edilmiştir. 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökölerek incirden küf izolasyonu için kullanılmıştır.

Besiyeri 2:***Aspergillus Flavus Parasiticus Agar (AFPA) (Oxoid CM731)***

Peptone	10.0
Yeast extract	20.0
Ferric amonniium citrate	0.5
Dichloran	0.002
Agar	15.0
Son pH	6.3± 0.2

22.75 g hazır besiyeri 500 ml. distile su içerisinde ısıtılarak çözölmüş ve 3 ml etil alkolde çözölmüş 1 vial chloramphenicol selective supplement eklenmiştir. 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 50°C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökölerek aflatoksin üretme yeteneğı olan küflerin izolasyonu ve tanısı için kullanılmıştır.

Besiyeri 3:***Malt Extract Agar (MEA) (Oxoid CM59)***

Malt ekstrakt	30.0 g
Mikolojik pepton	5.0 g
Agar	15.0 g
Son pH (25°C’ de)	5,4±0.2

50 g hazır besiyeri, 1000 ml distile su içerisinde çözölmüş ve otoklavda 115°C’de 10 dakika steril edilmiştir. Gerektiğinde ortamı asitleştirmek için otoklavdan sonra besiyeri 50°C’ye soğutulmuş ve %10 tartarik asit eklenmiştir. İzole edilen küflerin tanılanması için kullanılmıştır.

Besiyeri 4:***Czapek Dox Agar (CZA) (Oxoid, CM97)***

Czapek Konsantresi	10.0 ml
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Sukroz	30.0 g
Agar	17.5 g
Son pH (25°C' de)	6.8±0.2

45.4 g hazır besiyeri 1000 ml distile su içerisinde ısıtılarak çözülmüş ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek izole edilen küflerin tanılanması için kullanılmıştır.

Besiyeri 5:***Czapek Yeast Agar (CYA25, CYA37)***

K ₂ HPO ₄	1.0 g
Czapek Konsantresi	10 ml
Yeast Extract Powder	5.0 g
Sukroz	30.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

CZA besiyerine yeast extract powder eklenmiştir. Besiyeri içerikleri distile su içerisinde ısıtılarak çözülmüş ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek izole edilen küflerin tanılanması için kullanılmıştır.

Besiyeri 6:**%20 Sukrozlu Czapek Yeast Agar (CY20S)**

K ₂ HPO ₄	1.0 g
Czapek Konsantresi	10 ml
Yeast Extract Powder	5.0 g
Sukroz	200.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

CZA besiyerine uygun miktarlarda yeast extract powder ve sukroz eklenmiştir. Besiyeri içerikleri distile su içerisinde ısıtılarak çözülmüş ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek izole edilen küflerin tanılanması için kullanılmıştır.

Besiyeri 7:**Coconut Agar Medium (CAM)**

Kabukları soyularak küçük parçalar halinde doğranan 100 g hindistan cevizi 200 ml distile su ile 5 dakika Waring Blender içerisinde homojenize edilmiştir. Bu karışım Whatman No. 389 filtre kağıdından geçirilerek süzülmüştür. Süzüntünün pH'sı 2N NaOH ile 7'ye ayarlanarak 20 g/l agar eklenmiştir. Bu karışım kaynatılıp 50°C'ye soğutulduktan sonra pH kontrol edilerek; gerekirse yeniden 7'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra, 50°C'ye soğutulduktan sonra steril petri kaplarına dökülmüştür. 100 gram hindistan cevizinden genellikle 13-15 petri CAM hazırlanmıştır.

3.1.3.Çözeltiler

Çözelti 1:

Laktofenol Çözeltisi

Karbolik asit kristalleri	20.0 g
Laktik asit	20.0 g
Gliserin	40.0 g
Distile su	20 ml

Küflerin preparatlarının hazırlanması sırasında içerisine metilen mavisi eklenerek kullanılmıştır.

Çözelti 2:

Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi (FTS)

NaCl	85 g
Distile su	1000 ml

İncirden fungus izolasyonu sırasında seyreltme suyu olarak kullanılmıştır.

Çözelti 3:

PBS

Potasyum klorür	0.2 g
Dihidrojen fosfat	0.2 g
Disodyum hidrojen orto fosfat	1.16 g
Sodyum klorür	8 g
Distile su	0.9 lt

Çözelti içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 0.1 mol/lt HCl veya 0.1 mol/lt NaOH kullanarak pH 7.4'e ayarlanmış ve distile su 1 litreye tamamlanmıştır. Aflatoksin analizi için numune hazırlanması sırasında kullanılmıştır.

Çözelti 4:

HPLC mobil fazı

HPLC grade su	600 ml
Metanol	300 ml
Asetonitril	200 ml

Toplam 1100 ml'lik çözelti hazırlanmıştır. Bunun 100 ml'lik kısmı sarfedilerek 1000 ml'sine 120 mg potasyum bromür ve 100 µl saf nitrik asit eklenmiştir.

3.2. METOT

3.2.1. İncir homojenat ve dilüsyonlarının hazırlanması

Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarı'ndan ve Nazilli, Aydın, İncirlioza pazarlarından sağlanan incir örnekleri, tesadüfi olarak steril bir bistiiri ile alınıp, daha önceden darası alınmış steril bir kap içerisinde aseptik koşullar altında 50 ± 1 gram olmak üzere tartılmıştır. Daha sonra 450 ml steril fizyolojik tuzlu su içerisinde Waring blender ile homojenize edilmiştir. Bu dilüsyondan alınan 25 ml lik hacim, 25 ml steril fizyolojik tuzlu suya (Çözelti 2) aktararak 10^{-1} 'lik dilüsyon elde edilmiştir. Daha sonra gerekli diğer dilüsyonlar standart yöntemle göre hazırlanmıştır.

3.2.2. Kuru incirlerdeki küflerin izolasyonu ve sayılarının belirlenmesi

Kuru incir örneklerindeki küflerin izolasyonu ve sayısının belirlenmesi için yayma plaka tekniğı kullanılmıştır (Hartog, 1981). Hazırlanan dilüsyonlardan steril pipetlerle 0.1'er ml alınarak 20 ml Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Besiyeri 1) besiyeri içeren steril petri kutularına koyulmuştur. Bu süspansiyon L baget ile yayılarak kurumaya bırakılmıştır. Süspansiyon kuruduktan sonra petriler ters çevrili olarak 27°C 'de 5-7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda 10-100 küf kolonisi içeren petriler sayılmıştır (Hartog, 1981). Her bir seyreltme için 3 petri ile çalışılmıştır.

İnkübasyon sonucunda, petrilerdeki küf kolonileri sayılmıştır ve farklı küf kolonileri binoküler altında seçilerek, yatık "Malt Ekstrakt Agar" (Besiyeri 3) içeren tüplere inoküle edilerek 27°C 'de 5 günlük inkübasyondan sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3. Kuru incirlerden izole edilen küflerin tanılanması

İzole edilen *Aspergillus* türlerinin, “Malt Extract Agar” (Besiyeri 3), “Czapek Dox Agar” (Besiyeri 4), “Czapek Yeast Agar (CYA25, CYA37)” (Besiyeri 5) ve “%20 Sukrozlu Czapek Yeast Agar” (Besiyeri 6) içeren petrilere “üç nokta ekimi” yapılmıştır (Klich, 2002). CYA25 25°C’de, CYA37 37°C’de, diğer petrilere ise 27°C’de 7-10 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra küflerin tanılanması için, binoküler altında kültürel karakteristikleri ve mikroskopta da metilen mavili laktofenol çözeltisi kullanılarak hazırlanan preparatlarla mikroskobik karakterleri saptanmıştır. *Aspergillus* türleri, Klich (2002)’den yararlanılarak tanılanmıştır.

İzole edilen diğer küf genusları da “Malt Extract Agar” içeren petrilere tek nokta şeklinde ekilmiştir. Kültürel ve morfolojik özellikleri aynı şekilde saptanmış, tanılanmaları ise Domsch ve arkadaşlarına (1980) göre yapılmıştır.

3.2.3.1. Küf preparatlarının hazırlanması

Petride üretilen küf kolonilerinden öze ile örnek alınmış ve örnek, üzerine 1 damla laktofenol çözeltisi (Çözelti 1) damlatılmış lam üzerinde dağıtılarak lamel ile kapatılmıştır. Küflerin mikroskopta daha iyi gözlenmesini sağlamak için laktofenol çözeltisi içerisine metilen mavisi eklenmiştir.

3.2.4. Kuru incirlerde “*Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar (AFPA)” besiyeri kullanılarak aflatoksijenik küf suşlarının saptanması

“*Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar” (Besiyeri 2) 3.1.2.de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Sterilize edildikten sonra 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra, yaklaşık 20 ml olacak şekilde steril petrilere dökülmüştür. 3.2.1. de anlatıldığı gibi kuru incir örneklerinin seyreltmeleri hazırlanmıştır. AFPA besiyeri içeren petrilere her bir seyreltmeden 0.1 ml koyulmuş ve steril L baget ile yayılmıştır. Daha sonra bu petrilere 27°C’de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilere ters

çevrilerek incelenmiştir. Ters yüzey rengi parlak turuncu-sarı olan koloniler aflatoksijenik küf kolonileri olarak saptanmış ve yatık “Malt Ekstrakt Agar” içeren tüplere inoküle edilmiştir. 27 °C’de 5-7 günlük inkübasyondan sonra +4 °C’ de buzdolabında saklanmıştır. Daha sonra aflatoksijenik küf kolonilerinin preparatları hazırlanarak fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5. Kuru incirlerden izole edilen aflatoksijenik küf suşlarının

“Coconut Agar Medium (CAM)” da geliştirilmesi

“CAM” da aflatoksin üretimi

3.1.2. de anlatıldığı gibi hazırlanan CAM besiyeri (Besiyeri 7), steril petrilere dökülmüş ve incelenecek olan aflatoksijenik küf suşlarının her biri petrilerin tam ortasına inoküle edilmiştir. Petriler 27 °C’de 2-5 gün inkübe edilmiştir. İkinci günden sonra, tek, büyük bir koloni içeren her bir petrinin ters yüzü, 365 nm UV ışığı altında mavi floresansın varlığı veya yokluğu belirlenmek üzere incelenmiştir. İnoküle edilmemiş bir petri kontrol amacıyla kullanılmıştır.

3.2.6. Aflatoksin analizi (AOAC Approved Method, 1999)

Numune hazırlama

Ekstraksiyon;

Bütün petriler, UV ışığı altında kalitatif olarak incelendikten sonra, aflatoksinlerin doğrulanması ve belirlenmesi için, kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bunun için, CAM’da geliştirilen küf, besiyeri ile beraber (25g) bir Waring blendera alınmış ve üzerine 75 ml metanol, 50 ml distile su ve 5 g tuz eklenerek, 3 dakika blenderda karıştırılmıştır.

Aynı zamanda 100 gramlık bir incir örneği, 50’şer gramlık 2 parçaya ayrılmış, bu parçalardan biri 90 dakika UV ışığına maruz bırakılmıştır. Diğerine ise herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Bu iki incir örneğinden de aflatoksin ekstraksiyonu yapılarak analiz edilmiştir.

Dilüsyon;

Ekstrakt Whatman No. 4 filtre kağıdından süzildükten sonra, ekstrakt filtratından, pipetle 5 ml alınmış ve 5 ml filtrat, 10 ml PBS (Çözelti 3) veya saf su ile seyreltilmiştir.

Adsorbsiyon;

Afla-Prep immunoaffinity (Rhone-Biopharm) kolonları buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına gelmeleri sağlanmıştır. Immunoaffinity kolonlarının ağzı açılıp 4-5 damla PBS akıtılarak kolonun kuruması engellenmiştir. Plastik şırıngalar kolona takıldıktan sonra 15 ml'lik numune filtratı, akış hızı 3ml/d (saniyede 1 damla) olacak şekilde kolondan geçirilmiştir. Akış hızı maksimum 5ml/d olacak şekilde 20 ml su geçirilerek kolon yıkandıktan sonra 3-5 kez hava geçirilmiştir.

Elusyon;

Immunoaffinity kolonundan 1 ml metanol geçirilmiş ve metanolün kendiliğinden vialle akması beklenmiştir. Metanol geçişi tamamlandıktan sonra kolondan 1 ml su geçirilmiş ve solvent miktarı 2 ml.'ye tamamlanmıştır.

HPLC'ye enjeksiyon;

Otomatik enjeksiyonda, enjeksiyon hacmi kadar solvent kendiliğinden enjektör tarafından alınmaktadır. Enjeksiyon hacmi maksimum 50µl'dir. Hazırlanan numune solventinin enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Hesaplamalar;

Çarpım faktörü = $Wt (g) \times \text{filtrat (ml)} = \text{solvent (ml)} \times \text{elusyon (ml)}$

$Wt = \text{Numune ağırlığı (50 gr)}$

$\text{Filtrat hacmi} = \text{Kolondan geçen filtratın hacmi (5ml)}$

$\text{Solvent hacmi} = \text{Ekstraksiyonda kullanılan solvent hacmi (250ml)}$

$\text{Elusyon hacmi} = \text{Elusyondan sonraki son hacim (2 ml)}$

Software'den okunan sonuçlar çarpım faktörü (2) ile çarpılarak hesaplanır.

3.2.7. Ultraviyole ışınlarının kuru incirlerdeki küf florası üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Ultraviyole ışınlarının kuru incirlerdeki küf ve aflatoksijenik küf florası üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla analize getirilen her bir incir örneğinin 100 gramı kullanılmıştır. 100 gr incir örneğinden 50 gram alınarak steril petri kutusuna koyulmuş ve steril bir bistüri yardımıyla yayılmıştır. Daha sonra petri kutuları, UVP marka, UVGL-58 model, 120 watt, Mineralight Lamp içeren UV kabini içerisine, UV lambasının yaklaşık 25 cm altına (Aziz, 2002b), kapakları açık olarak koyulmuştur. 365nm dalga boyundaki UV ışınına 60', 90' ve 120' olmak üzere farklı sürelerde maruz bırakılan incir örnekleri 3.2.1. de anlatıldığı gibi homojenize edilerek seyreltmeleri hazırlanmış ve ekimleri yapılmıştır. Aynı işlemler, ultraviyole ışınına maruz bırakılmayan incir örnekleri için de yapılmıştır. 27°C'de 5 gün inkübasyondan sonra üreyen küf kolonileri sayılmıştır.

Ekimler, UV uygulamasından hemen sonra yapılmıştır. Enerji stabilizasyonunun sağlanması için lamba en az 30 dakika önce açılmıştır.

4. ARAşTIRMA BULGULARI VE TARTIşMA

4.1 Araştırma Bulguları

4.1.1 Yayma plaka tekniği ile kuru incir örneklerindeki küf sayısının belirlenmesi

Çalışmamızda, 32'si Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarı'ndan sağlanan ve 18'i açık olarak Nazilli, Aydın ve İncirlioza pazarlarında alınan olmak üzere, toplam 50 kuru incir ve ezme örneğinde, yayma plaka yöntemi kullanılarak her bir örneğin içerdęi küf sayısı belirlenmiştir.

Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarı'ndan alınan kuru incir örneklerinin içerdęi küf sayısı Çizelge 5' de verilmiştir. Toplam 32 örneğin 12'sinde üreme görölmezken diğer 20 örnekte ise en düşük küf sayısı 1.1×10^3 koloni/g, en yüksek küf sayısı ise 1×10^4 olarak saptanmıştır.

Çizelge 6'de ise açık olarak satılan kuru incir örneklerinin içerdęi küf sayıları verilmiştir. 18 örneğin 8'inde üreme gözlenmezken 10'unda en düşük küf sayısı 1.0×10^3 koloni/g, en yüksek küf sayısı ise 8.0×10^3 olarak saptanmıştır.

Çizelge5. Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarı'ndan alınan kuru incir ezmelerinin içerdiği küf sayısı ve her bir örneğin içerdiği küf türleri.

ÖRNEK NO	KÜF SAYISI (koloni/g)
1 <i>A.niger, Trichoderma, Acremonium</i>	4.8×10^3
2 <i>A.niger, Fusarium</i>	2.0×10^3
3 <i>A.niger, A.flavus*, Trichoderma</i>	1.1×10^3
4 <i>A.niger, A.flavus*, Trichoderma</i>	5.5×10^3
5 <i>A.niger, Fusarium</i>	3.5×10^3
6 <i>A.niger, Trichoderma</i>	1×10^4
7 <i>A.niger, Fusarium, Acremonium</i>	9.5×10^3
8 <i>A.niger, Trichoderma, Fusarium</i>	5.0×10^3
9 <i>A.niger, A.parasiticus*, Trichoderma (2 tane), Fusarium, Acremonium</i>	9.5×10^3
10 <i>A.terreus, Trichoderma</i>	5.9×10^3
11 <i>A.niger, A.terreus, Trichoderma, Fusarium</i>	3.5×10^3
12 <i>A.niger, A.fumigatus, Acremonium</i>	4.0×10^3
13 <i>A.flavus*, Trichoderma, Acremonium</i>	6.6×10^3
14 <i>A.niger, Fusarium</i>	3.0×10^3
15 <i>A.fumigatus, Trichoderma</i>	4.0×10^3
16 <i>A.niger, Trichoderma, Fusarium, Acremonium</i>	9.0×10^3
17 <i>A.flavus, Trichoderma</i>	7.0×10^3
18 <i>A.niger, Acremonium</i>	6.2×10^3
19 <i>A.niger, A.candidus, Fusarium</i>	9.6×10^3
20 <i>A.niger, A.terreus, Fusarium, Acremonium</i>	5.2×10^3
21	-
22	-
23	-
24	-
25	-
26	-
27	-
28	-
29	-
30	-
31	-
32	-

- Üreme gözlenmedi

* Kantitatif aflatoksin analizi yapılan izolatlar

Çizelge 6. Açık olarak satılan kuru incir örneklerinin içerdiği küf sayısı ve her bir örneğin içerdiği küf türleri.

ÖRNEK NO	KÜF SAYISI (koloni/g)
1 <i>A. niger</i> (6 tane), <i>A. flavus</i> (2 tane), <i>A. fumigatus</i> , <i>Acremonium</i>	6.5×10^3
2 <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Fusarium</i>	2.2×10^3
3 <i>A. niger</i> (5 tane), <i>A. flavus</i> , <i>Trichoderma</i> (2 tane)	1.0×10^3
4 <i>A. niger</i> (2 tane), <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Fusarium</i>	7.0×10^3
5 <i>A. niger</i> (3 tane), <i>Trichoderma</i> , <i>Acremonium</i>	1.0×10^3
6 <i>A. niger</i> (2 tane), <i>A. flavus</i> , <i>Acremonium</i>	1.0×10^3
7 <i>A. niger</i> (2 tane), <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Trichoderma</i> (2 tane), <i>Fusarium</i> (3 tane)	8.0×10^3
8 <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. flavus</i> (2 tane), <i>A. fumigatus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>Trichoderma</i> (2 tane), <i>Acremonium</i>	6.0×10^3
9 <i>A. niger</i> (3 tane), <i>A. flavus</i> , <i>Trichoderma</i>	1.0×10^3
10 <i>A. niger</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Trichoderma</i> (2 tane), <i>Fusarium</i> , <i>Acremonium</i>	7.0×10^3
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	-

- Üreme gözlenmedi

4.1.2 Kuru incirlerden izole edilip tanılanmış küfler

Analiz edilen toplam 50 kuru incir örneğinden elde edilen 127 izolattın *Aspergillus Link ex Gray 1821*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Acremonium* olmak üzere 4 küf genusu içerdiği saptanmıştır.

Çizelge 7. Kuru incir örneklerinden izole edilmiş olan küf genuslarının dağılımı.

KÜF GENUSLARI	İZOLAT SAYISI	DAĞILIMI (%)
<i>Aspergillus Link ex Gray</i>	74	58.3
<i>Trichoderma sp.</i>	24	18.9
<i>Fusarium sp.</i>	16	12.6
<i>Acremonium sp.</i>	13	10.2
Toplam	127	100

Çizelge 7 incelendiğinde %58.3 ile *Aspergillus* genusunun ilk sırada, %18.9 ile *Trichoderma*'nın 2. sırada, %12.6 ile *Fusarium*'un 3. sırada ve %10.2 ile *Acremonium*'un 4. sırada yer aldığı görülmüştür.

Kuru incir örneklerinden izole edilen birbirinden farklı 4 tane küf türü Çizelge 7'de gösterilmiş olup, bunlardan 74 tane tür *Aspergillus* genusuna, 24 tane tür *Trichoderma* genusuna, 16 tane tür *Fusarium* genusuna, 13 tane tür *Acremonium* genusuna aittir.

4.1.2.1 Kuru incir örneklerinden izole edilmiş olan *Aspergillus* türleri

Çizelge 8 incelendiğinde *Aspergillus niger*'in hem açıkta satılan incirlerde (%55.3) hem de Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarı'ndan alınan incirlerde (%59.3) dominant tür olduğu görülmüştür. Bunu sırasıyla *A.flavus*, *A.terreus*, *A.fumigatus*, *A.candidus*, *A.parasiticus* izlemektedir.

Çizelge 8. Kuru incir örneklerinden izole edilmiş olan *Aspergillus* türlerinin dağılımı

ASPERGİLLUS TÜRLERİ	İZOLAT SAYILARI					
	Açıkta satılan örnekler	%	Özel Gıda Lab. Örnekleri	%	Toplam	%
<i>Aspergillus niger</i>	26	55.3	16	59.3	42	56.7
<i>Aspergillus flavus</i>	12	25.6	4	14.8	16	21.6
<i>Aspergillus terreus</i>	4	8.5	3	11.1	7	9.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	8.5	2	7.4	6	8.1
<i>Aspergillus candidus</i>	1	2.1	1	3.7	2	2.7
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0	0	1	3.7	1	1.4
Toplam	47	100	27	100	74	100

4.1.2.2 Kuru incirlerden izole edilmiş olan küfler

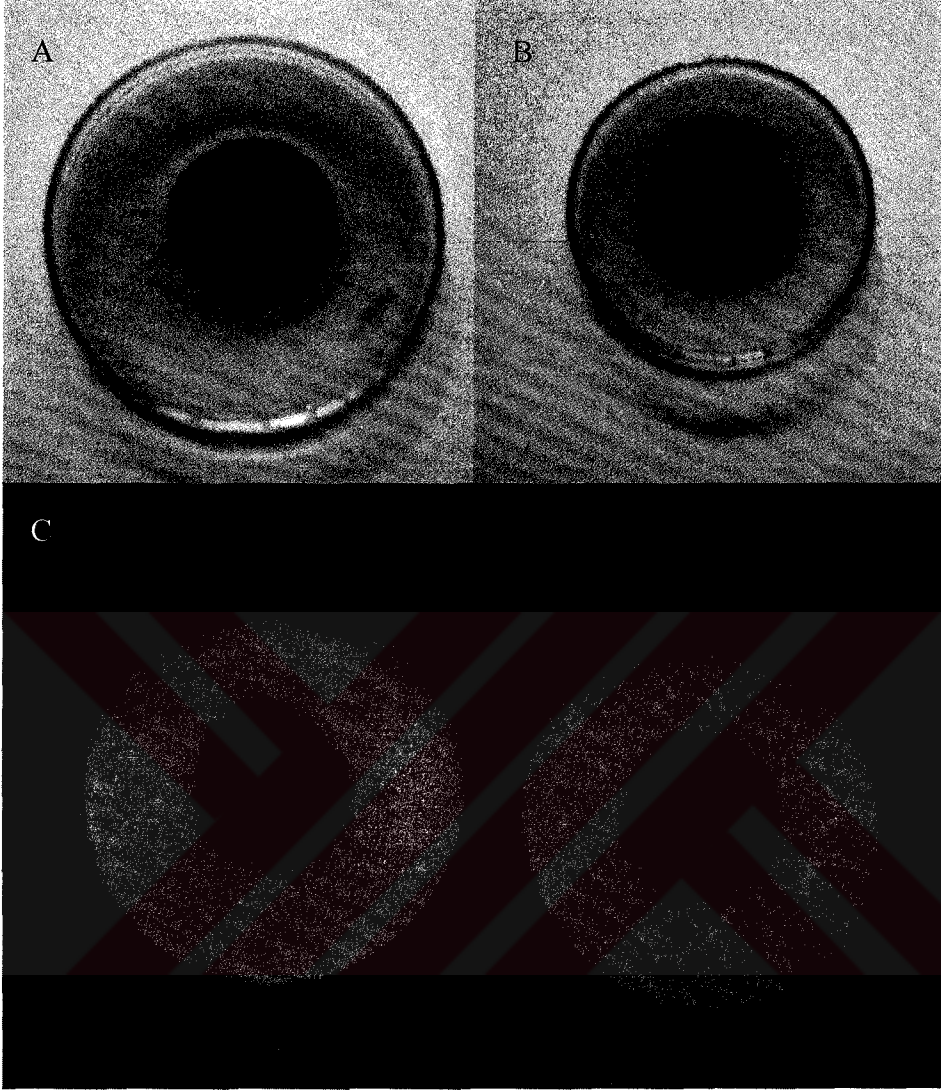
Çizelge 9. Kuru incir örneklerinden izole edilmiş olan küfler.

<i>KÜF ADI</i>	<i>REFERANS</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	Klich, 2002
<i>Aspergillus niger</i>	Klich, 2002
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Klich, 2002
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Klich, 2002
<i>Aspergillus tamarii</i>	Klich, 2002
<i>Aspergillus terreus</i>	Klich, 2002
<i>Aspergillus candidus</i>	Klich, 2002
<i>Acremonium sp.</i>	Domsch ve ark., 1980
<i>Trichoderma sp.</i>	Domsch ve ark., 1980
<i>Fusarium sp.</i>	Domsch ve ark., 1980

4.1.3. Kuru incirlerden izole edilip tanılanmış aflatoksijenik küfler

4.1.3.1. Coconut Agar Medium'da floresan veren küfler

Kuru incir örneklerinden elde edilen izolatlar ayrı ayrı CAM besiyerine ekilerek 365nm UV ışığı altında mavi floresansın varlığı veya yokluğu belirlenmek üzere incelenmiştir. Bu incelemeye göre, elde edilen 17 aflatoksijenik izolatın 4 tanesinin floresan renk verdiği gözlenmiştir. Bu izolatlar Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarından sağlanan 3,4,9 ve 13 numaralı incir örneklerinden elde edilmişlerdir. Bu izolatların 3'ü *A.flavus* 1'i *A.parasiticus*'dur.



Şekil 3. 'CAM' besiyerinde A. *A. flavus*'un 27°C'de 7 günlük koloni görünümü; B. *A. parasiticus*'un 27°C'de 7 günlük koloni görünümü; C. 'CAM' besiyerinde 365nm. UV ışık altında floresan veren *A. flavus*'un görünümü.

4.1.3.2. Aflatoksijenik *Aspergillus* türleri

Kuru incir örneklerinden “RBCA” ve “AFPA” besiyeri kullanılarak 16 tane *A.flavus* ve 1 tane *A.parasiticus* olmak üzere toplam 17 tane aflatoksijenik küf izole edilmiştir.

Aspergillus flavus Link (Klich, 2002)

Subgenus: *Circumdati* Section: *Flavi*

Koloni çapları: 7 günde, CYA25: 65mm.; MEA: 70mm.; CY20S: 60mm.; CYA37: 55mm.; CZ: 50mm.

Koloni rengi ve dokusu: CYA25’de konidiler koyu yeşil, zeytin yeşili veya zeytin rengi olmakta, bazen soluk, grimsi-sarıdan, sarıya kadar olan renklerle kaplı alanlar bulunabilmektedir. Miselyum beyaz; sklerotia var ise, koyu kahverengiden siyaha kadar renklerde olmakta ve şekilleri ve büyüklükleri değişken olmaktadır. Eksudat var ise, renksizden kahverengiye kadar değişen renklerde olabilmektedir. Ters yüzey rengi renksiz, donuk kahverengi veya portakal rengi olabilmekte; koloni dokusu değişken olmakla beraber, genelde 2-3 mm. derinlikte, lanozdan flukkoza kadar değişmektedir. MEA’da konidialar yeşil veya koyu yeşil; miselyum beyaz ; sklerotia bazen bulunur ve kahverengi-siyah olabilmekle beraber, şekil ve büyüklük açısından değişkendir. Ters yüzey genelde renksiz, bazen donuk sarı renklerde; koloniler özellikle merkezde flukkoz olmaktadır. CY20S’deki koloni karakterleri, CYA25’deki koloni karakterlerine, eksudanın olmaması ve genelde üretilen parlak sarı ters yüzey rengi dışında benzemektedir. CYA37’deki konidia rengi, zeytin renginden zeytini-kahverengiye kadar değişebilmektedir. Diğer renkler ve dokular ise CYA25’dekiler gibi olmaktadır. CZ’deki koloni morfolojisi CYA25’deki gibi olmaktadır.

Mikroskopik karakteristikler: Konidial başlar, radyattan kolumnara kadar değişik şekillerde olabilmektedir. Konidioforlar, 400µm-1mm boyunda, çeperleri genellikle hafif pürüzlü, bazen fazla pürüzlü, genellikle renksiz, bazen soluk kahverengi; vesiküller, globozdan uzamış hale kadar değişik şekillerde, 20-45µm çapında

olmaktadır; tek veya çift serili olabilmekle beraber, CYA25’de izolatların çoğu çift serili, ayrıca bazıları MEA’da tamamen tek serili olmaktadır. Metula, 8-10 x 5-7 µm boyutları arasındadır; fiyalidler, 7-12 x 3-4 µm olmaktadır. Konidia, globozdan elipse kadar değişen şekillerde ve 3-6 µm çapında, konidia çeperleri düzden oldukça pürüzlüye kadar değişen şekillerde olmaktadır.

Ayırt edici özellikleri: Bu türün diğerlerinden farklı en önemli özellikleri, pürüzlü çeperli fiyalidler ile yayılan sarı-yeşil kolonileri ve düzden oldukça pürüzlüye kadar değişen ve 3-6 µm çapındaki konidialarıdır. *A.flavus*, *A.oryzae*’den daha az flukkoz olan dokusu ile, daha yeşil renkleri ile ve daha küçük konidiaları ile ve *A.parasiticus*’dan da pürüzsüz sporları ile ayrılır.

İlişkili türler: *A. nomius*, *A. flavus*’dan hem B hem de G aflatoksinlerini üretmesi ile ayrılabilir. Yeni birkaç türden olan *A. bombycis* (Peterson ve ark., 2001), CYA37’de yavaş gelişmekte (1 haftada 0-37mm.) ve düz konidiyofor çeperlerine sahiptir.

Habitatları: *A. flavus*, dünyanın her yerinde yayılış göstermektedir. En fazla bildirilen gıda kaynaklı fungustur ve iç ve dış ortamlarda, çürümüş bitkiler, ekin tohumları ve diğer substratlar üzerinde kolonize olurlar. *A. flavus*, böcek ve hayvan patojeni olarak bildirilmektedir. İzolatların yaklaşık yarısı çok kuvvetli bir karsinogen olan aflatoksin oluşturmaktadır (Domsch ve ark., 1980).

Temel mikotoksinleri: Aflatoksin B₁, siklopiazonik asit, 3-nitropropiyonik asit.

***Aspergillus parasiticus* Speare (Klich, 2002)**

Subgenus: *Circumdati* Section: *Flavi*

Koloni çapları: 7 günde, CYA25: 65mm; MEA: 70mm; CY20S: 60mm; CYA37: 55mm; CZ: 50mm.

Koloni renkleri ve dokusu: CYA25’de konidialar koyu zeytin rengi veya koyu yeşil; miselyum beyaz; sklerotia ara sıra oluşturulur ve kahverengiden siyaha kadar olan renklerde olabilmektedir. Eksuda var olduğunda şeffaftır; ters yüzeyi renksiz.

donuk pembemsi-kırmızı veya donuk sarı, bazen kahverengi olmaktadır; koloniler genelde alçak, kadifemsi olmakla beraber, bazı izolatlar flukkoz hale dönüşmektedirler. MEA'da konidial alanlar zeytin veya koyu yeşil renkte olmaktadır; miselyum genelde belirsizdir, bazen flukkoz öbekler görülmektedir. kahverengiden siyaha kadar değişen renklerde sklerotia ara sıra oluşmaktadır; ters yüzey renksizdir veya donuk sarıdan donuk yeşile kadar renklerde olan gölgeler taşımaktadır; koloniler flukkozdur, ve yoğun değildir. CY20S'deki koloniler CYA25'dekilere göre genelde biraz daha sarı-yeşil olmaktadır ve koloniler CYA25'deki koloni özellikleri ile, ters yüzeyinin sarı, turuncu veya donuk yeşil olması dışında, benzerdir. CYA37'de, eksuda yoktur; bazen sarıdan kahverengiye kadar değişebilen renklerde çözünür pigment oluşturulur; diğer karakteristikler CYA25'deki gibidir. CZ'deki koloniler CYA25'deki kolonilerden kadifemsi olmaya daha yatkındır, diğer karakteristikler CYA25'deki gibidir.

Mikroskobik karakteristikler: Konidial başlar genelde radyat; konidiyoforlar 250-500 μm ., çeperleri pürüzlü veya çok pürüzlü, renksiz; vesiküller 20-35 μm . genişlikte, globoz veya hafifçe uzamış; baskın olarak tek serili, bazı izolatlarda çift serili; metula varsa, 7-10 x 3-7 μm .; fiyalidler 8-11 x 3-5 μm . uzunluğundadırlar. Konidialar globoz, 3,5-6 μm çapında, oldukça pürüzlü çepere sahiptirler.

Ayrt edici özellikleri: Koyu sarı-yeşil konidial alanlar, baskın olarak tek serili, 3.5-6 μm çapında oldukça pürüzlü konidialar üreten, küresele yakın vesiküllere sahip konidial başlar, bu türü diğerlerinden ayrt edilmesini sağlar. *A. parasiticus*, *A. sojae*'den daha küçük konidiaları, kadifemsi dokusu ve koyu yeşil koloni rengi ile ayrılabilir. Antibiyotikli ortamdaki gelişme oranı *A. parasiticus*'u *A. sojae*'den ayırabilir. *A. parasiticus*, *A. flavus*'dan pürüzlü çeperli konidiaları ile kolayca ayrılabilir.

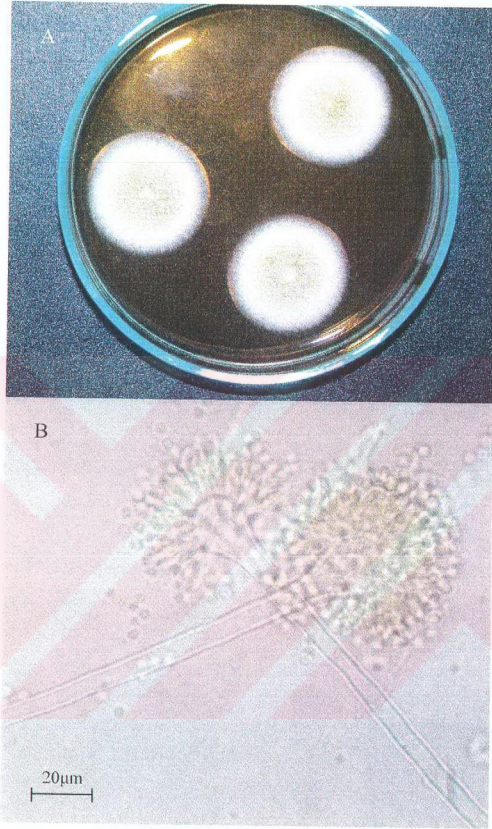
Habitatları: Az sayıda yayında *A. parasiticus*'un çeşitli topraklarda var olduğu bildirilmiştir. Bildirilen izolasyonların bu denli az sayıda olması, araştırmacıların *A. parasiticus*'u *A. flavus*'dan ayrt etmekte zorlanmalarından kaynaklanmaktadır.

A.parasiticus, tohumlardan, diğ er bitki parçalarından ve böceklerden sıklıkla izole edilmektedir (Domsch ve ark., 1980).

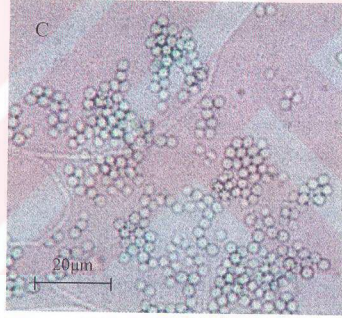
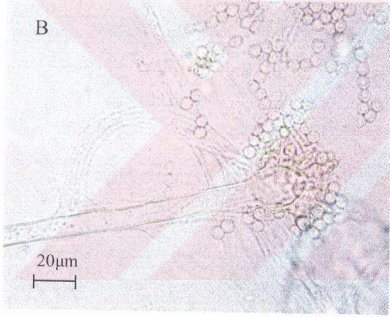
Temel mikotoksinleri: Aflatoksin B₁ B₂ G₁ G₂.



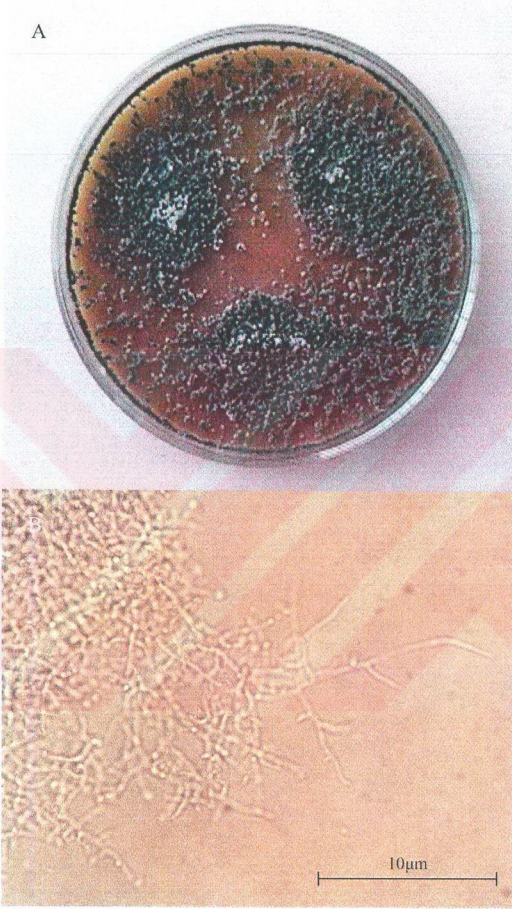
Şekil 4. *A. flavus*'un A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidiofor ve konidial baş; C. Konidial baş.



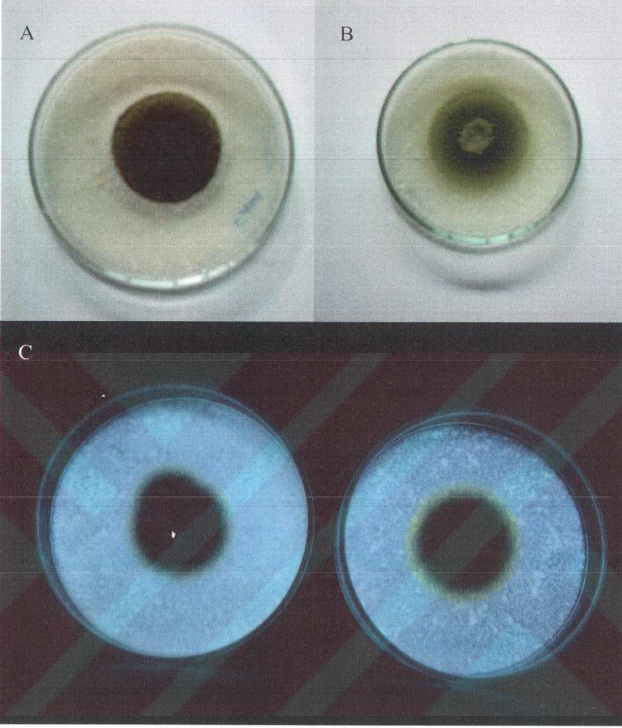
Şekil 5. *A. parasiticus*'un A. MEA'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidiofor ve konidial baş.



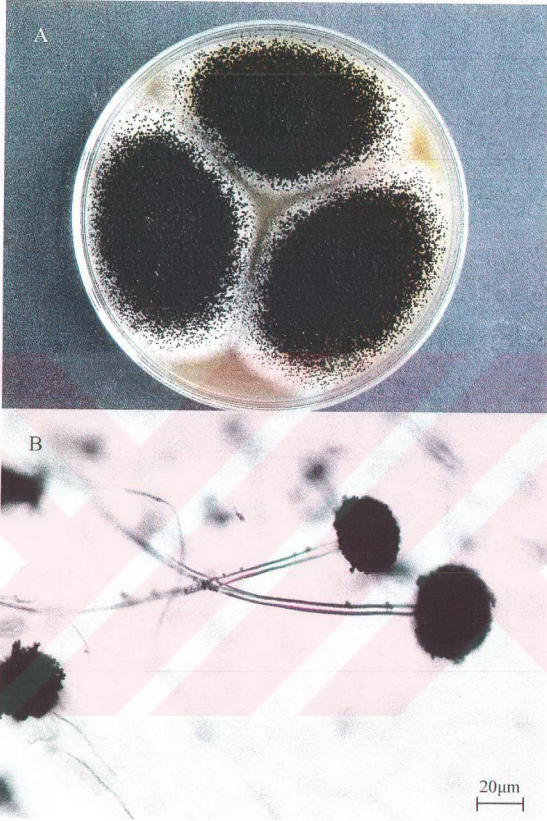
Şekil 9. *A. candidus*'un A. CYA'daki 25°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidiofor ve konidial baş; C. Konidia.



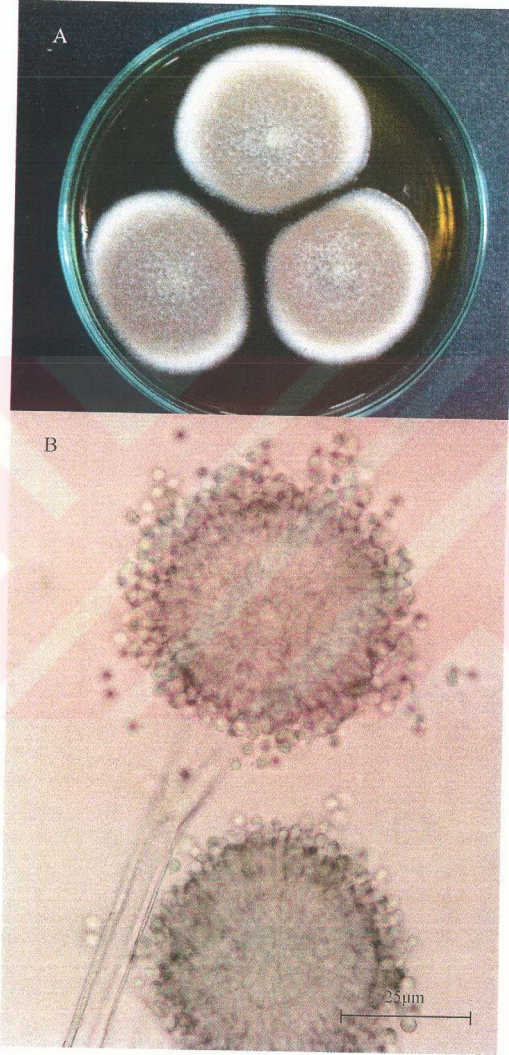
Şekil 10. *Trichoderma* sp.'nin A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Mikroskopik görünümü.



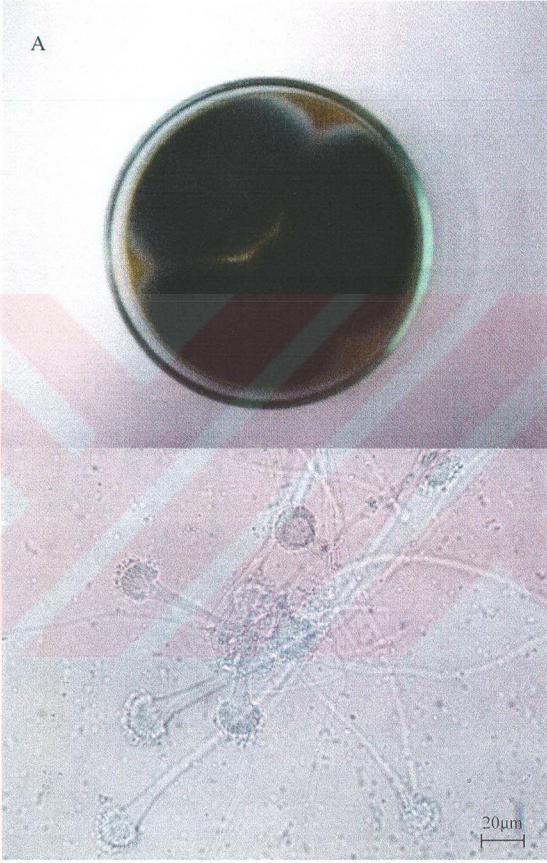
Şekil 3. 'CAM' besiyerinde *A. A.flavus*'un 27°C'de 7 günlük koloni görünümü; B. *A. parasiticus*'un 27°C'de 7 günlük koloni görünümü; C. 'CAM' besiyerinde 365nm. UV ışık altında floresan veren *A. flavus*'un görünümü.



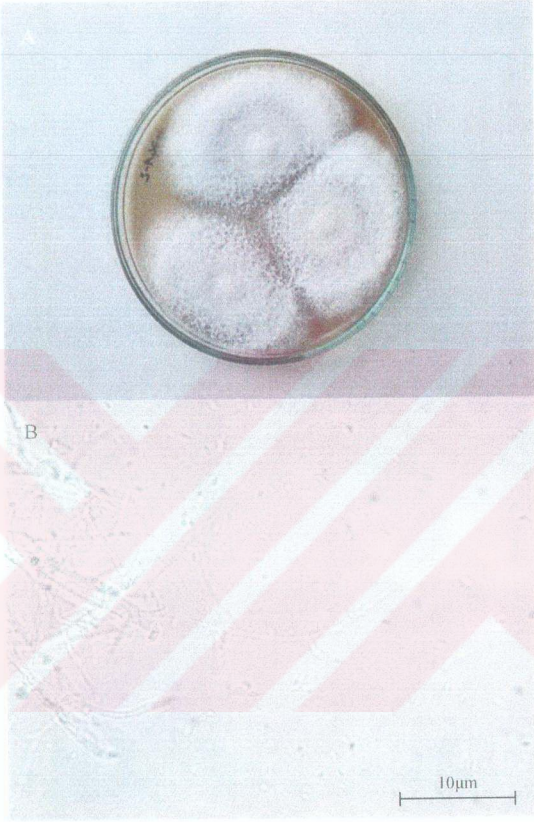
Şekil 6. *A. niger*'in A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidiofor ve konidial baş.



Şekil 7. *A. terreus*'un A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü;
B. Konidiofor ve konidial baş.



Şekil 8. *A. fumigatus*'un A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Konidiofor ve konidial baş.



Şekil 11. *Acremonium sp.*'nin A. M.E.A.'daki 27°C'de 7 günlük görünümü; B. Mikroskopik görünümü.

4.1.4.Ultraviyole ışınlarının kuru incirlerdeki küf florası üzerindeki etkileri

Ultraviyole ışınlarına maruz bırakılan incir örneklerindeki toplam küf florası sayımı yapılmıştır. Bu amaçla 3.2.1. ve 3.2.2. de anlatılan işlemler uygulanmıştır. 2 tekrarlı olarak yapılan ekimler 3 ardışık seyreltme esas alınarak sayılmıştır. Toplam küf sayıları 2 tekrardan elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Bu sayımlara göre elde edilen sonuçlar Tablo 1'deki gibidir. Tablodaki UV (-) ifadesi, UV ışınına maruz kalmamış incir örneğinden elde edilen fungal sayım sonuçlarını; UV (+) ifadesi ise, UV ışınına maruz bırakılan incir örneğinden elde edilen fungal sayım sonuçlarını göstermektedir. 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} ifadeleri ise ardışık 3 seyreltmeyi göstermektedir.

Çizelge 10. 60 dakika UV ışınına maruz bırakılan incir örneklerinin toplam fungal sayım sonuçları.

60 dk	I		II		III	
ÖRNEK	UV(-) 10^{-1}	UV(+) 10^{-1}	UV(-) 10^{-2}	UV(+) 10^{-2}	UV(-) 10^{-3}	UV(+) 10^{-3}
1	48	47	14	14	3	2
2	20	20	4	4	1	1
3	11	11	3	2	0	0
4	55	50	7	5	0	0
5	35	32	4	3	0	0
6	100	91	55	48	12	10
7	95	90	35	32	10	8
8	50	55	15	13	3	3
9	95	91	32	30	6	5
10	59	56	16	15	9	6
11	35	33	20	20	12	10
12	40	42	21	18	5	4
13	66	50	48	45	12	12
14	30	31	13	9	3	3
15	40	38	32	28	9	9
16	90	85	36	32	8	7
17	70	63	38	35	5	5
18	62	56	20	17	3	3
19	96	86	50	48	7	6
20	52	50	15	14	3	3

Çizelge 11. 90 dakika UV ışınına maruz bırakılan incir örneklerinin toplam fungal sayım sonuçları.

90 dk	I		II		III	
ÖRNEK	UV(-)10 ⁻¹	UV(+)10 ⁻¹	UV(-) 10 ⁻²	UV(+)10 ⁻²	UV(-)10 ⁻³	UV(+)10 ⁻³
1	48	38	14	11	3	1
2	20	20	4	6	1	0
3	11	8	3	1	0	0
4	55	40	8	7	0	0
5	32	28	3	1	0	0
6	100	40	0	0	0	0
7	100	70	32	24	7	2
8	47	35	12	10	1	0
9	98	65	26	18	5	2
10	50	32	10	8	1	0
11	35	20	20	11	12	2
12	45	30	18	10	3	0
13	63	51	48	37	11	6
14	28	12	13	4	1	0
15	43	28	31	15	10	2
16	81	60	31	13	9	2
17	78	52	26	11	5	1
18	56	29	15	2	1	0
19	93	66	48	16	7	2
20	48	37	14	11	3	0

Çizelge 12. 120 dakika UV ışınına maruz bırakılan incir örneklerinin toplam fungal sayım sonuçları.

120 dk	I		II		III	
ÖRNEK	UV(-)10 ⁻¹	UV(+)10 ⁻¹	UV(-) 10 ⁻²	UV(+)10 ⁻²	UV(-)10 ⁻³	UV(+)10 ⁻³
1	50	35	15	8	3	0
2	22	12	4	1	1	0
3	10	5	4	1	0	0
4	55	40	8	6	0	0
5	35	25	5	1	0	0
6	90	45	35	12	5	0
7	98	95	33	25	8	1
8	50	30	15	8	5	1
9	95	60	30	15	5	0
10	51	25	9	4	4	1
11	36	21	21	10	8	2
12	40	28	11	3	3	0
13	60	48	47	30	12	5
14	30	12	11	4	1	0
15	45	20	31	15	9	2
16	75	60	30	12	9	1
17	74	51	30	10	5	0
18	58	30	17	3	1	0
19	89	65	45	17	7	1
20	50	33	15	11	5	1

4.1.4.1. İstatistiksel analizler

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler, iki yönlü varyans analizi ile analiz edilmiş ve ortalamalar Minitab12 paket programı kullanılarak, LSD (Least Significance Difference) testi ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 13. 60' UV ışını uygulaması sonuçlarının ortalamaları.

	UV uygulaması	N	Ortalama	Standart Sapma	Min.	Max.
I	(-)	20	57.45	26.70	11	100
	(+)	20	53.85	24.13	11	91
II	(-)	20	23.90	15.93	3	55
	(+)	20	21.60	14.85	2	48
III	(-)	20	5.55	4.12	0	12
	(+)	20	4.85	3.60	0	12

Çizelge 14. 90' UV ışını uygulaması sonuçlarının ortalamaları.

	UV uygulaması	N	Ortalama	Standart Sapma	Min.	Max.
I	(-)	20	56.55	26.96	11	100
	(+)	20	38.05	17.78	8	70
II	(-)	20	18.80	13.93	0	48
	(+)	20	10.80	8.70	0	37
III	(-)	20	4.0	4.01	0	12
	(+)	20	1.0	1.49	0	6

Çizelge 15. 120' UV ışını uygulaması sonuçlarının ortalamaları.

	UV uygulaması	N	Ortalama	Standart Sapma	Min.	Max.
I	(-)	20	55.65	24.64	10	98
	(+)	20	37.0	21.64	5	95
II	(-)	20	20.80	13.38	4	47
	(+)	20	9.80	7.84	1	30
III	(-)	20	4.55	3.49	0	12
	(+)	20	0.75	1.20	0	5

Çizelge 16. 60', 90' ve 120' UV uygulaması sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları ve önem testi sonuçları.

	I	II	III	N
Ortalama				
Süre	Ö.S.	**	***	
60	55.65 ^a	22.75 ^a	5.20 ^a	40
90	47.30 ^a	14.80 ^b	2.50 ^b	40
120	46.33 ^a	15.30 ^b	2.65 ^b	40
UV	**	**	***	
(-)	56.55 ^a	21.17 ^a	4.7 ^a	60
(+)	42.97 ^a	14.07 ^b	2.2 ^b	60

Aynı harfle gösterilenler birbirine yakın değerlerdir.

** : %1'e göre önemlidir ($P < 0.01$).

*** : %0.1'e göre önemlidir ($P < 0.001$).

Ö.S.: İstatiksel olarak önemli değildir.

- I. Grup için: Süre, önemsiz; UV işlemi, %1'e göre önemli
- II. Grup için: Süre, %1'e göre önemli; UV işlemi, %1'e göre önemli
- III. Grup için: Süre, %0.1'e göre önemli; UV işlemi, %0.1'e göre önemli.

Sonuçlar:

1. Her 3 seyreltme için UV'ye maruz kalma süresi ve koloni sayıları arasındaki ters orantılı ilişki önemli bulunmuştur.
2. (+) ve (-) UV uygulaması karşılaştırıldığında; tüm örneklerde ve sürelerde, UV'ye maruz kalma ve kalmama arasında önemli bir fark gözlenmiştir.
3. UV'ye maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında; Her 3 seyreltmede de 90' ve 120' UV'ye maruz kalma süreleri 60'ya göre daha önemli bulunmuştur.

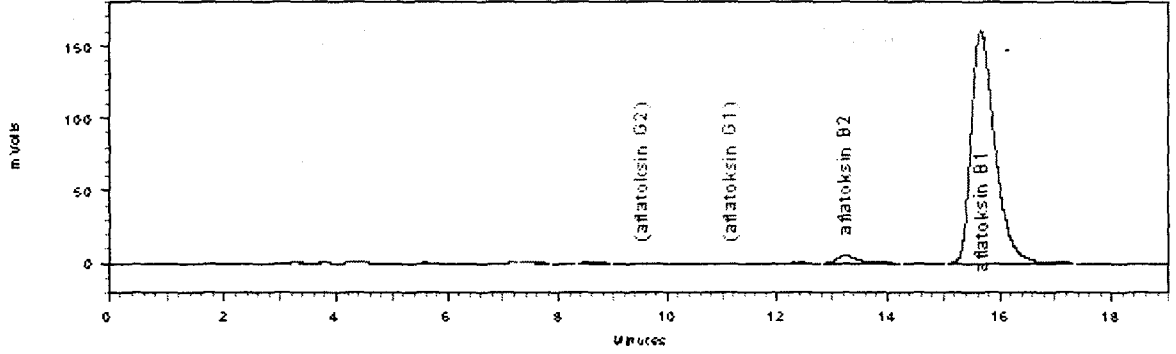
4.1.5. Aflatoksijenik küflerin ürettiği aflatoksin miktarları

CAM'da geliştirilen 4 aflatoksijenik suşun ürettiği aflatoksin miktarları, HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar sayfa 76, 77, 78, 79'daki şekillerde verilmiştir. Sonuçlar, 3.2.6. daki hesaplamalar bölümünde açıklandığı gibi çarpım faktörü (2) ile çarpılarak hesaplandığında, elde ettiğimiz 4 izolatın, 111.44 ppb, 302.84 ppb, 153.06 ppb ve 310.1 ppb aflatoksin ($B_1 + B_2$) ürettiği bulunmuştur.

ANALİZ EDİLEN NUMUNENİN:

DOSYA ADI
System 2

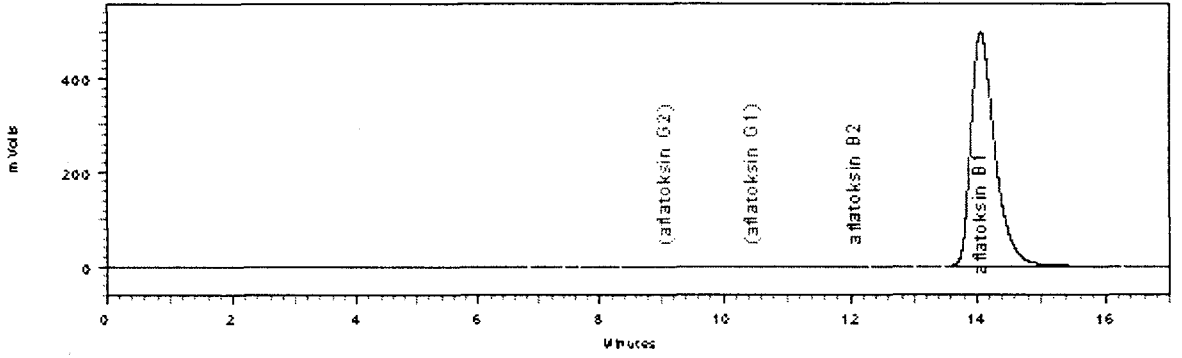
C:\CLASS-VP\Data\ışman\17 06 2004 1563A-3

ANALİZ SONUCU:

	Alınma zamanı	Pik Alanı	Konsantrasyon	Birimi
aflatoxin G2			0,00 BDL	ppb
aflatoxin G1			0,00 BDL	ppb
aflatoxin B2	13,22	130943	0,93	ppb
aflatoxin B1	15,66	4670451	54,79	ppb
Totals		4801394	55,72	

ANALİZ EDİLEN NUMUNENİN:

KODU : CAM
 DOSYA ADI : 1563-A AFPA3
 System 2

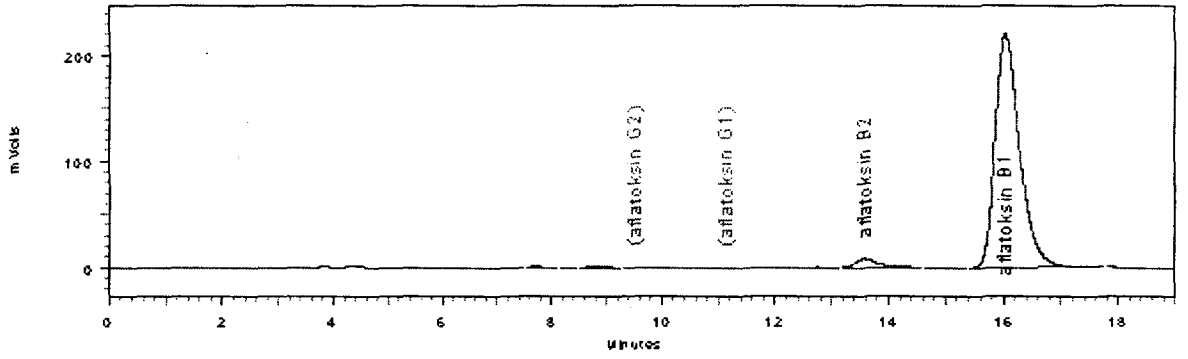
ANALİZ SONUCU:

	Alınma zamanı	Pik Alanı	Konsantrasyon	Birimi
aflatoxin G2			0,00 BDL	ppb
aflatoxin G1			0,00 BDL	ppb
aflatoxin B2	12,04	10586	0,04	ppb
aflatoxin B1	14,06	12901474	151,38	ppb
Totals		12912060	151,42	

ANALİZ EDİLEN NUMUNENİN:

DOSYA ADI
System 2

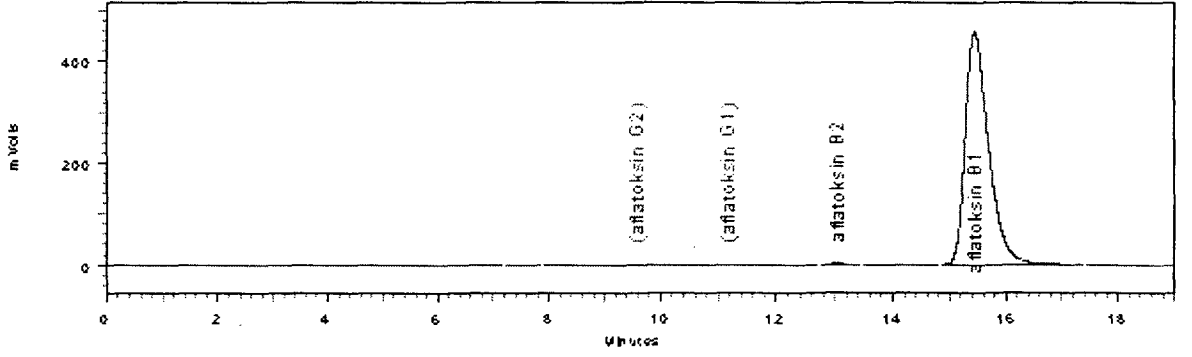
: C:\CLASS-VP\Data\ışman\17.06.2004_1563 b-AFPAt

ANALİZ SONUCU:

	Alıkonma zamanı	Pik Alanı	Konsantrasyon	Birimi
aflatoksin G2			0,00 BDL	ppb
aflatoksin G1			0,00 BDL	ppb
aflatoksin B2	13,57	203351	1,47	ppb
aflatoksin B1	16,02	6398273	75,06	ppb
Totals		6601624	76,53	

ANALİZ EDİLEN NUMUNENİN:

DOSYA ADI : C:\CLASS-VP\Data\ışman\17.06.2004_1074A-3
System 2

ANALİZ SONUCU:

	Alıkonma zamanı	Pik Alanı	Konsantrasyon	Birimi
aflatoxin G2			0,00 BDL	ppb
aflatoxin G1			0,00 BDL	ppb
aflatoxin B2	13,05	12040	0,05	ppb
aflatoxin B1	15,44	13209730	155,00	ppb
Totals		13221770	155,05	

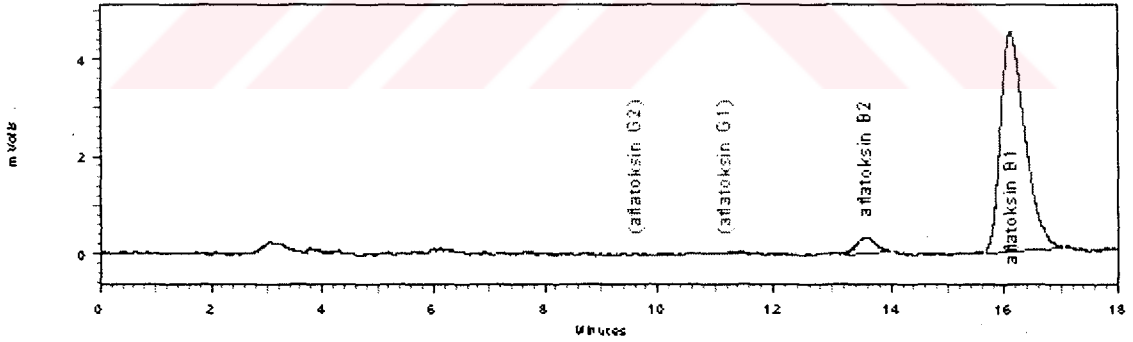
4.1.6. UV'ye maruz bırakılan incir örneğinin aflatoksin miktarındaki değişimin belirlenmesi

Aflatoksijenik küf içerdiğini belirlediğimiz bir incir örneği 50'şer gramlık iki eşit parçaya ayrılarak bu parçalardan biri, 90 dakika UV ışınına tutulmuştur. Diğerine ise herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Daha sonra bu iki incir örneği analiz edilerek aflatoksin içerikleri saptanmıştır. Bu işlem sonucunda her iki incirin içerdiği aflatoksin miktarları sayfa 80 ve 81'deki şekillerde verilmiştir. Analizler sonucunda, UV uygulanmamış incir örneğinin, 1.59×2 ppb aflatoksin içerdiği, 90' UV uygulanmış incir örneğinin ise 1.19×2 ppb aflatoksin içerdiği bulunmuştur. Buna göre UV uygulanmış incir örneklerindeki aflatoksin miktarının %25 oranında azaldığı belirlenmiştir.

ANALİZ EDİLEN NUMUNENİN:

DOSYA ADI : C:\CLASS-VP\Data\ışman\17.06.2004_72B1(-)
System 2

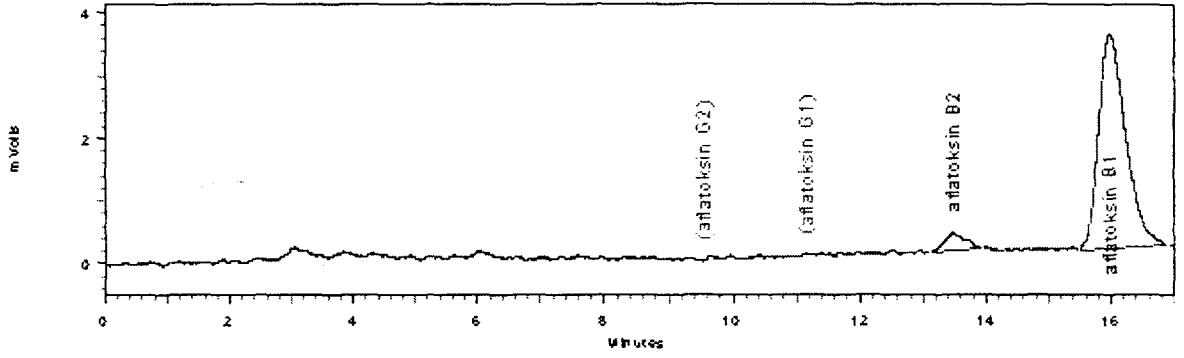
ANALİZ SONUCU:



	Alınma zamanı	Pik Alanı	Konsantrasyon	Birimi
aflatoksin G2			0,00 BDL	ppb
aflatoksin G1			0,00 BDL	ppb
aflatoksin B2	13,57	7788	0,02	ppb
aflatoksin B1	16,10	135576	1,57	ppb
Totals		143364	1,59	

ANALİZ EDİLEN NUMUNENİN:

DOSYA ADI : C:\CLASS-VP\Data\ışman\17.06.2004_72B1 +
System 2

ANALİZ SONUCU:

	Alınma zamanı	Pik Alanı	Konsantrasyon	Birimi
aflatoxin G2			0,00 BDL	ppb
aflatoxin G1			0,00 BDL	ppb
aflatoxin B2	13,49	6659	0,01	ppb
aflatoxin B1	15,97	101665	1,17	ppb
Totals		108323	1,19	

4.2. TARTIŞMA

Küfler ve mayalar gıdalarımızın doğal mikrofloralarında yer alan mikroorganizmalardır ve besin maddelerinde küflerin gelişimi ve mikotoksin oluşumu uzun yıllardır süregelen bir problemdir. Gıdaların küflerle kontaminasyonu; tarımsal ürünlerde bozulmalara, ürünün besin değerinde kayıplara neden olduğu için ekonomik açıdan; gıdalara kontamine olan küflerin toksik metabolitler oluşturması nedeniyle de insan ve hayvan sağlığı açısından önemlidir.

Son yıllarda, mikrobiyoloji başta olmak üzere, gıda mühendisliği, veteriner hekimlik ve ziraat mühendisliği gibi bir çok farklı disiplin tarafından gıdalarda küflerin gelişimi ve mikotoksin oluşumu konularında pek çok araştırma yapılmıştır. Bu alanda, gıda mikrobiyolojisi açısından yapılan çalışmalar, fındık, fıstık gibi yağlı tohumlar; kuru incir, kuru kayısı, kuru üzüm gibi kurutulmuş meyveler ve çilek, elma, dut, erik, armut, hurma gibi meyveler üzerinde yapılmıştır. Yapılan bu araştırmalar, bu gıdaların küf florası ve bu küflerin, en önemli mikotoksinlerden olan, aflatoksini oluşturma potansiyelleri üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Aflatoksinlerin ve aflatoksin üreten küflerin, birçok gıda maddesi açısından incelenmesine karşılık, özellikle Ege Bölgesi için önemli bir ekonomik değeri olan kuru incirler üzerinde yapılan çalışma sayısı oldukça azdır.

Kuru incirler, aflatoksijenik küflerden olan *A.flavus* ve *A.parasiticus*'un gelişimi için duyarlı bir ürün olduğundan (Buchanan ve ark., 1975; Steiner ve ark., 1988; İçibal ve Altuğ, 1992) yüksek oranda aflatoksin ile bulaşabilmektedir.

Aydın yöresindeki incir işletmelerinde genellikle, kuru incirlerdeki aflatoksin oranının azaltılması amacıyla fiziksel işlemlerden seleksiyon yöntemine ağırlık verilmektedir. Bu yöntemde, aflatoksinlerin uzun dalga boylu UV ışığı altında parlak sarı-yeşil floresans vermesi (Bullerman, 1979; Groopman, 1988) özelliğinden yararlanılarak, yüzeyinde floresan gözlenen incirler seçilmektedir. Bu yolla aflatoksin içeriği %50'ye varan oranlarda azaltılabilmektedir. Fakat ürünler bir küf bozulması ya da floresan göstermediği halde mikotoksinleri önemli ölçüde

içerebilmektedir. Bu yüzden seleksiyonla son üründe başlangıçtan düşük aflatoksin düzeyine ulaşılsa bile, çoğu kez kontaminasyonun tamamı giderilememektedir. Bu nedenle, Aydın yöresindeki kuru incirler halen aflatoksin tehdidi ile karşı karşıya kalmaktadır.

Çalışmamızda Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarı'na aflatoksin analizi amacıyla getirilen 32 tane kuru incir ezme örneği ve Nazilli, Aydın ve İncirliova pazarlarından alınan 18 tane kuru incir örneği kullanılmıştır. Toplam 50 kuru incir örneğinin 30 tanesinde fungus gelişimi görülmüştür. Bu veriler, Aydın'da üretilen kuru incirlerde, hasat, kurutma ve depolama şartları, kuru incirlerin doğal küf floraları veya kontaminasyondan kaynaklanan bir küf florası olduğuna işaret etmektedir.

Çalışmamızda, kuru incirlerden izole edilen *Trichoderma* genusu, doğada yaygın olarak toprakta ve havada bulunan ve diğer fungusların biyolojik kontrolünde kullanılan bir genustur. *Fusarium* genusu ise, genellikle bitki ve balık patojeni olan ve konidiumları havada yaygın olarak bulunan bir genustur. *Acremonium* ve *Aspergillus* genusları da toprakta ve havada yaygın olarak bulunan genuslardandır (Alexopoulos, 1995).

TÜBİTAK küf kataloğu (1999) yayınındaki bilgilere göre, çalışmamızdan elde ettiğimiz, *Acremonium*, *Fusarium*, *Trichoderma* ve *Aspergillus* genusları, daha önce kuru incirler de dahil olmak üzere farklı gıdadan izole edilmiştir. Bu fungus türlerinin kuru incirlerde yaygın olarak bulunması, kuru incir meyvelerinin yüksek nem ve şeker içerikleri göz önüne alınırsa normal bir sonuçtur.

1977 yılında İzmir ve Aydın yöresindeki çeşitli incir işletmeleri ve Tarih merkez depolarından alınan 56 tane kuru incir ve ezmelerinin küf florası incelenmiştir. Bu çalışmada toplam 138 küf türü izole edilmiş ve bu izolatlardan çoğunluğunun *Aspergillus* ve *Penicillium* genusuna ait türler olduğu belirtilmiştir. Bunların dışında *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Chaetomium*, *Absidia*, *Geotrichum* ve *Mucor* genuslarına ait türler de izole etmişlerdir (Aşkın ve ark., 1977 a). Çalışmamızda ise analizi yapılan 50 kuru incir örneğinden elde edilen 127 izolatın

Aspergillus, *Fusarium*, *Trichoderma* ve *Acremonium* olmak üzere, 4 küf genusu içerdiği saptanmıştır.

Karapınar ve arkadaşları (1989) tarafından Ege Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada ise, 1986 ürünü 206 tane sergi ve 78 tane depo örneği incelenmiş ve mikroflora saptanmıştır. Toplam 206 sergi örneğinden 27 farklı küf türü tanımlanmış ve *A.niger* türü en yaygın tür olarak saptanmıştır. 206 örnekten 47'sinden *A.flavus* izole edilirken, örneklerin hiçbirisinde *A.parasiticus*'a rastlanmamıştır. Depo örneklerinde de *A.niger* türü en sık rastlanan tür olmuştur. Çalışmamızda ise, 18'i açık olarak satılan, 32'si ise Aydın Ticaret Borsası'ndan alınan 2003-2004 ürünü incir örnekleri incelenmiştir. Elde edilen 127 izolatta 4 farklı küf genusu saptanmıştır. Bunlar; *Fusarium*, *Acremonium*, *Trichoderma* genusları ve *Aspergillus* genusunda; *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.niger*, *A.fumigatus*, *A.candidus* ve *A.terreus* türleridir. *A.niger* türü, hem açık olarak satılan kuru incir örneklerinde hem de kuru incir ezme örneklerinde en sık rastlanan tür olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kuru incir örneklerinden "Rose Bengal Chloramphenicol Agar" besiyeri kullanarak 16 tane *A.flavus* ve 1 tane *A.parasiticus* olmak üzere 17 tane aflatoksijenik küf izole edilmiştir. Ayrıca kuru incir örneklerinin içerdikleri küf sayımları, 1 gram kuru incirde 1.1×10^3 ile 10^4 arasında değişen sayılarda bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi, Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (2001) tarafından kurutulmuş meyveler ve sebzeler için önerilen en fazla küf sayısı (1×10^4) göz önüne alınarak değerlendirme yapıldığında, çalışmamızda elde edilen küf sayılarının bu değere yakın olduğu ortaya koyulmuştur.

Pitt ve ark. (1983) tarafından formüle edilen *Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar besiyerinde (AFPA), *A.flavus* ve *A.parasiticus* kolonilerinin 30°C'de 42-44 saat inkübasyondan sonra petri altında turuncu-sarı renk oluşturdıkları bildirilmiştir. Bu besiyerinin aflatoksijenik küf suşlarının saptanmasında etkili olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda, "AFPA" besiyeri kullanılarak 16 *Aspergillus flavus* ve 1 *A.parasiticus* türü tanımlanmıştır. Bu küf izolatları "AFPA" besiyerinde yoğun, turuncu-sarı ters yüzey rengi oluşturmuştur. AFPA besiyerinin, *Aspergillus flavus* ve

A.parasiticus türlerinin tanımlanmasında kullanılabilecek olan kolay ve etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, gıdalardan ve hayvan yemlerinden *A.flavus* gruba giren yüzlerce suş izole edilmiş ve bunların aflatoksin üretme yetenekleri incelenmiştir (Bullerman, 1974). Fakat çok farklı substratlardan izole edilen çok sayıdaki izolatin test edilmesi için çok fazla zaman ve güce ihtiyaç vardır. Lin ve Dianese (1976), aflatoksin tayini için önerdikleri “CAM” besiyerini, besin maddelerindeki aflatoksin üreten küflerin yoğunluğunu saptamak ve aflatoksin üreten küflerin elenmesini kolaylaştırmak için, daha hızlı ve basit bir yöntem olması için geliştirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz 17 aflatoksijenik küf izolatinin aflatoksin üretilip üretilmediğinin belirlenmesinde “CAM” besiyeri kullanılmıştır. Küf suşlarının her biri CAM ortamına inokule edilip, 3-4 gün 27 ° C’de inkübe edildikten sonra, UV lambası altında floresans verip vermedikleri incelenmiştir. “CAM” besiyerinde 4 izolatin floresan verdiği gözlenmiştir. Daha sonra bu izolatların gerçekten aflatoksin üretilip üretilmediklerini belirlemek için 3.2.7 de anlatıldığı gibi ekstraksiyon ve kolon kromatografisi yapılmıştır. Sonuçta, elde ettiğimiz 4 izolatin, 111.44 ppb., 302.84 ppb., 153.06 ppb. ve 310.1 ppb. olmak üzere aflatoksin B₁ + B₂ ürettiği bulunmuştur. Ayrıca, “CAM” besiyerinin, kuru incirlerdeki aflatoksin üreten küflerin elenmesini kolaylaştırmak için, hızlı ve basit bir yöntem olduğu ve tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamız, fungusların kuru incirlere kontamine olup aflatoksin üretmelerini engelleyici yöntemleri araştırmayı amaçladığı için, aflatoksinlerin detoksifikasyonunda kullanılan ultraviyole ışınlarının, fungus florası üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Fungusların gamma ışınlamasına karşı hassas oldukları ve mikotoksin üretiminin gıdaların ışınlanmasından sonra azaldığını işaret eden pek çok yayın bulunmaktadır (Refai ve ark., 1996; Yousef , Mahrous ve Aziz, 1999). Aziz ve arkadaşlarının (2002) yaptığı bir çalışmada gamma radyasyonunun, mikotoksin üreten küfler ve meyvelerdeki mikotoksinler üzerine etkileri incelenmiştir. Meyve

örneklerinin ışınlaması, oda sıcaklığında, 1.5, 3.5, ve 5.0 kGy düzeylerinde yapılmıştır. Fungal koloni oluşturan birimler, seri dilüsyonlar yapılarak ve örneklerin Potato Dextrose Agar'a iki tekrarlı şekilde ekilmesi ile belirlenmiştir. Aynı işlemler, gamma ışını ile ışınlanmamış meyve örnekleri ile de tekrarlanmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler sayılmış ve 1 gram örnekteki koloni oluşturan birim sayısı, gamma ışını ile ışınlanmış ve ışınlanmamış meyve örnekleri için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Ayrıca her bir ışınlanmış ve ışınlanmamış meyve örneği, HPLC kullanılarak mikotoksin içerikleri yönünden analiz edilmiştir. Bu çalışmada, 1.5 ve 3.5 kGy dozla ışınlanan meyve örneklerinde toplam fungal sayının azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, farklı meyve örneklerinin fungal floralarının, gamma ışınlarına karşı hassas olduğunu ve 5,0 kGy dozunda tamamen inhibe olduklarını göstermiştir.

Aziz ve arkadaşları tarafından (2002a) yapılan diğer bir çalışmada ise yine gamma ışınlamasının, mısırlardaki *Aspergillus flavus* tarafından üretilen aflatoksin B₁ üzerine olan etkileri incelenmiştir. Işınlama dozlarının artırılması ile mısırdaki toplam canlı *A.flavus* sayısı azalmış ve fungus, 3.0 kGy dozunda tamamen inhibe olmuştur. Aflatoksin B₁'in miktarı ise, 1.0 ve 1.5 kGy dozlarda artmış ve 3.0 kGy gamma ışınlamasından sonra, 45 gün depolamadan sonra bile, aflatoksin üretimi olmamıştır. Sonuç olarak, *A.flavus*'ün gelişmesi, ışınlama dozu, depolama koşulları ve substrat kompozisyonunun aflatoksin B₁ üretiminde önemli rol oynadığı ortaya çıkmıştır.

2000 yılında Zeinab ve arkadaşları tarafından *Nigella sativa* tohumları üzerinde yapılan bir çalışmada, gamma radyasyonunun toplam canlı fungal yükün ve mikotoksin üretiminin üzerindeki etkileri incelenmiştir. Buna göre; tohum örneklerinin, 0.25'den 6 kGy'e kadar değişen dozlarda radyasyona maruz bırakılması sonucunda, tohumların fungal yükü, radyasyon dozu arttıkça azalmıştır. Aynı zamanda 2.5 kGy'den daha fazla dozlarda ışınlanan tohum örneklerinden izole edilen fungusların mikotoksin üretme kapasitelerinin de oldukça azaldığı gözlenmiştir. Fakat 0.75 kGy miktardaki dozun total aflatoksini artırdığı bulunmuştur. Schindler ve arkadaşları (1980), bu artışın fungal mutasyonlara bağlı olduğunu bildirmiştir.

Altuğ ve Yousef (1990) tarafından yapılan bir çalışmada ise incirlerdeki AFB₁'in, sodyum bisülfid, sıcaklık, ve UV etkenlerinin kombinasyonları ile degradasyonu araştırılmıştır. Buna göre bisülfid, bisülfid + hidrojen peroksit (H₂O₂) ve UV işlemlerinde sırası ile; %68.4, %65.5 ve %45.7 degradasyon sağlanmıştır.

1985 yılında Yousef ve Marth tarafından yapılan bir çalışmada, 10, 30 ve 60 dakika ışınlanan AFM₁'li sütlerin HPLC ile aflatoksin analizleri yapılmıştır. Buna göre; 10, 30 ve 60 dakika UV ile ışınlanan sütlerde sırası ile, %42, %65 ve %100 AFM₁ degradasyonu sağlanmıştır. Bu çalışma sonucunda, ultraviyole enerjisinin sütteki AFM₁'i degrade ettiği, degradasyon oranının UV enerjisine maruz kalma süresine bağlı olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda, 60', 90' ve 120' olmak üzere 3 farklı sürede UV 'ye maruz bırakılan kuru incirlerde UV'ye maruz kalma süresi ve toplam küf sayıları arasındaki ters orantılı ilişki istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (+) ve (-) UV uygulamaları karşılaştırıldığında; tüm örneklerde ve sürelerde, UV'ye maruz kalmış ve kalmamış incir örneklerinin içerdiği küf sayılarında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmiştir. UV'ye maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise; her 3 seyreletmede de 90' ve 120' UV'ye maruz kalma süreleri 60'ya göre daha önemli bulunmuştur. Bu sonuç istatistiksel analizlerle desteklenmiştir.

Aynı zamanda, 90' U.V'ye bırakılan incir örneğinden yapılan aflatoksin analizi sonucunda, aflatoksin miktarının, U.V'ye bırakılmadan önceki aflatoksin miktarından %25 oranında düşük olduğu gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda toplam 50 kuru incir örneğinin 30 tanesinde fungus gelişimi görülmüştür. Bu veriler, Aydın'da üretilen kuru incirlerde, hasat, kurutma ve depolama şartları, kuru incirlerin doğal küf floraları veya kontaminasyondan kaynaklanan bir küf florası olduğuna işaret etmektedir.

Elde edilen 127 izolatta 4 farklı küf genusu saptanmıştır. Bunlar; *Fusarium*, *Acremonium*, *Trichoderma* genusları ve *Aspergillus* genusunda; *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.niger*, *A.fumigatus*, *A.candidus* ve *A.terreus* türleridir. *A.niger* türü, hem açık olarak satılan kuru incir örneklerinde hem de kuru incir ezme örneklerinde en sık rastlanan tür olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kuru incir örneklerinden 16 tane *A.flavus* ve 1 tane *A.parasiticus* olmak üzere 17 tane aflatoksijenik küf izole edilmiştir. Ayrıca kuru incir örneklerinin içerdikleri küf sayımları, 1 gram kuru incirde 1.1×10^3 ile 10^4 arasında değişen sayılarda bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi, Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (2001) tarafından kurutulmuş meyveler ve sebzeler için önerilen en fazla küf sayısı (1×10^4) göz önüne alınarak değerlendirme yapıldığında, çalışmamızda elde edilen küf sayılarının bu değere yakın olduğu ortaya koyulmuştur.

Çalışmamızda, "AFPA" besiyeri kullanılarak 16 *Aspergillus flavus* ve 1 *A.parasiticus* türü tanılanmıştır. Bu küf izolatları "AFPA" besiyerinde yoğun, turuncu-sarı ters yüzey rengi oluşturmuştur. AFPA besiyerinin, *Aspergillus flavus* ve *A.parasiticus* türlerinin tanılanmasında kullanılabilecek olan kolay ve etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz 17 aflatoksijenik küf izolatının aflatoksin üretilip üretilmediğinin belirlenmesinde "CAM" besiyeri kullanılmıştır. "CAM" besiyerinde 4 izolatın floresan verdiği gözlenmiştir. Sonuçta, elde ettiğimiz 4 izolatın, 111.44 ppb., 302.84 ppb., 153.06 ppb. ve 310.1 ppb. olmak üzere aflatoksin B₁ + B₂ ürettiği bulunmuştur. Ayrıca, "CAM" besiyerinin, kuru incirlerdeki

aflatoksin üreten küflerin elenmesini kolaylaştırmak için, hızlı ve basit bir yöntem olduğu ve tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, kuru incirin UV'ye maruz kalma süresi ve kuru incirde üreyen toplam küf sayıları arasındaki ters orantılı ilişki istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. UV'ye maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise; her 3 seyreltmede de 90' ve 120' UV'ye maruz kalma süreleri 60''ya göre daha önemli bulunmuştur. Aynı zamanda, 90' U.V'ye bırakılan incir örneğinden yapılan aflatoksin analizi sonucunda, aflatoksin miktarının, U.V'ye bırakılmadan önceki aflatoksin miktarından %25 oranında düşük olduğu gözlenmiştir.

Gıda ve yemlerde aflatoksin oluşumunun önlenmesi hem sağlık hem de ekonomi açısından büyük önem taşımaktadır. Aflatoksinler funguslar tarafından oluşturulduktan sonra birçok kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntem ile daha az toksik maddelere dönüştürülebilirler veya kısmen parçalanabilirler, fakat bu işlemler gıdanın besin değerinde kayıplara veya görünümünde değişimlere neden olabilmektedir. Bu yüzden, aflatoksin oluşumunun önlenmesinde öncelikle hammaddenin tarlada gelişimi, hasatı, depolanması, nakliyesi, ürüne işlenmesi ve ürün elde edilmesi aşamalarındaki küf kontaminasyonunun engellenmesi veya en aza indirilmesi önemlidir. Bunun için de incir işletmelerinin özellikle depolama koşullarında hijyen ve sanitasyon önlemlerini alması, küf gelişimini en aza indirecek koşulları oluşturması gerekmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile, incir işletmelerinde aflatoksinli incirlerin seçilmesi amacıyla kullanılan UV ışınlarının, belli bir doza kadar kuru incirlerdeki toplam küf sayısını azalttığı belirlenmiştir. Bu da depolama sırasında UV ile sterilizasyonun, işletmelerde küf gelişiminin azaltıcı bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucunu doğrulamaktadır. Aynı zamanda UV ile ışınlama tekniğinin basit, kullanışlı, ucuz ve güvenilir olma özelliklerinin, bu tekniğin kullanım alanlarını artıracığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda UV ışınlaması sonucunda toplam fungal yükün ve aflatoksinlerin azaldığı belirlenebilmiştir. Aflatoksinlerin UV ile parçalanabildiği

ile sterilizasyonun, işletmelerde küf gelişiminin azaltıcı bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucunu doğurmaktadır. Aynı zamanda UV ile ışınlama tekniğinin basit, kullanışlı, ucuz ve güvenilir olma özelliklerinin, bu tekniğin kullanım alanlarını artıracakı düşünülmektedir.

Çalışmamızda UV ışınlaması sonucunda toplam fungal yükün ve aflatoksinlerin azaldığı belirlenebilmiştir. Aflatoksinlerin UV ile parçalanabildiği bilinmektedir. Fakat UV ışınlamasının aflatoksin üreten funguslar üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca çalışmamızda küf üremesi gözlenmeyen incir örneklerinde aflatoksin analizi yapılamamıştır. Küf üremesi gözlenmeyen gıdalarda da aflatoksinin var olabileceği göz önüne alınırsa bu çalışmanın da yapılması gerekmektedir.



ÖZET

Bu çalışmada ihracatımız açısından büyük öneme sahip olan kuru incirlerdeki küf florası ve aflatoksin oluşumu ele alınmış, kuru incirlerdeki küf florası ve aflatoksinler üzerine ultraviyole ışınlarının etkileri incelenmiştir.

Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Laboratuvarı'ndan alınan 32 kuru incir ezme örneği ve Aydın, Nazilli ve İncirliova pazarlarından alınan 18 kuru incir örneği kullanılmıştır. Toplam 50 örneğin küf florası incelenmiş ve aflatoksijenik olanlar belirlenmiştir. İzole edilen 127 izolatın *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* ve *Acremonium* olmak üzere 4 küf genusuna ait olduğu saptanmıştır. 127 izolatın 74'ü *Aspergillus*, 24'ü *Trichoderma*, 16'sı *Fusarium* ve 13'ü *Acremonium* genusuna aittir. *Aspergillus* genusuna ait, *A.niger*, *A.flavus*, *A.terreus*, *A.fumigatus*, *A.candidus* ve *A.parasiticus* olmak üzere 6 farklı tür izole edilmiştir. Bunların arasında *A.flavus* türüne ait 3, *A.parasiticus* türüne ait ise 1 aflatoksijenik suş elde edilmiştir.

50 kuru incir örneğinin 32'sinde küf üremesi görülmüş ve 1 g. kuru incirdeki küf sayısı $1.1 \times 10^3 - 10^4$ arasında bulunmuştur. Ayrıca açıkta satılan kuru incirlerle Gıda Laboratuvarı'na incir işletmelerinden gelen kuru incirler karşılaştırıldığında, pazarlarda açık olarak satılan incirlerin küf yükünün daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, incelenen örneklerdeki küf sayılarının Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde (1997) önerilen değer ile yakınlık gösterdiği ortaya konmuştur.

Çalışmamızda aflatoksijenik türlerin belirlenmesinde AFPA besiyerinden yararlanılmıştır. Aflatoksijenik suşların aflatoksin üretme yeteneklerinin saptanmasında ise CAM besiyeri kullanılmıştır. AFPA besiyerinde sarı-turuncu ters yüzey pigmentasyonu gösteren 17 aflatoksijenik suşun 4'ünün CAM besiyerinde floresans verdiği gözlenmiştir. Yapılan kantitatif analizler sonucunda bu 4 izolatın gerçekten de aflatoksin ürettiği belirlenmiştir.

Ayrıca, kantitatif aflatoksin analizini yaptığımız bir incir örneğinin toplam aflatoksin içeriğinin 3.18 ppb olduğu bulunmuştur. Bu değer Türkiye'de gıda ve

yemlerde bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri (B_1 için 5 ppb; $B_1+B_2+G_1+G_2$ için 10 ppb) ve AB ülkelerinde aflatoksinlere dair uygulanan yürürlükteki limitler (B_1 için 2 ppb; $B_1+B_2+G_1+G_2$ için 4 ppb) ile uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca ultraviyole ışınlarının kuru incirlerdeki küf florası ve aflatoksinler üzerine etkileri incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda U.V ışınlarının uygulama süresinin arttıkça kuru incirlerdeki küf sayısının azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, 90' UV ışını uygulamasının kuru incirlerdeki aflatoksin miktarını %25 oranında azalttığı gözlenmiştir.

Elde edilen bu verilerle, UV ışınlaması ile, kuru incirlerdeki küflerin ve dolayısıyla aflatoksijenik küf suşlarının üremesinin baskılanabileceği ve UV ışınlamasının ucuz ve pratik bir yöntem olması nedeniyle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

In this study, mold flora and aflatoxin production in dried figs which were considered to be one of the major agricultural export product of our country, have been taken up and the effect of UV irradiation on mold flora of dried figs and aflatoxins have been examined.

32 dried fig pastes that were taken from Food Control Laboratory of Commodity Exchange of the Aydın Province and 18 dried fig samples that were taken from Aydın, Nazilli and İncirliova bazaars were examined. The mold flora of 50 samples were studied and the aflatoxigenic ones were determined. It was determined that the 127 isolates which were isolated, were belongs to the genus *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* and *Acremonium*. Isolated molds are, 74 *Aspergillus*, 24 *Trichoderma*, 16 *Fusarium* and 13 *Acremonium* out of 127.

Mold growth was detected 32 of 50 dried fig samples and the amount of mold in dried figs were found 1.1×10^3 to 10^4 in 1 g dried fig. Also, if dried figs that were taken from Food Control Laboratory of Commodity Exchange of the Aydın Province compared with the dried figs that were sold in bazaars, it was found out that the mold load in dried figs that were sold in bazaars were relatively higher.

In our study, the AFPA medium is used for detection of aflatoxigenic species. And CAM is used to detect aflatoxin producing ability of aflatoxigenic strains. It was observed that the 4 of 17 aflatoxigenic strain which were showed yellow-orange reverse pigmentation in AFPA medium, were gave fluorescence in CAM. By the results of the quantitative analyses, it was found that these 4 strains had produced aflatoxins truly.

In addition, the fig sample that analyses quantitatively was found to contain 3.18 ppb. total aflatoxin. This datum is appropriate with the aflatoxin limits applied at E.U. and Türkiye.

Also in our study, the effects of UV irradiation on the mold flora and aflatoxins in dried figs have been examined. At the end of the investigations, it was found that increasing time of UV irradiation lead to an decrease in the mold count indried figs. In addition, a UV irradiation applicated for 90', was found to decrease the aflatoxin quantity in dried figs in an amount of 25%.

According to these data, it was found that the reproduction of the molds in dried figs, consequently the aflatoxigenic mold strains, can be depressed by UV irradiation. Because of inexpensiveness and easiness of the application it was concluded that the UV irradiation can be used commonly.



TEŞEKKÜR

YÜKSEK Lisans tez çalışmam süresince danışmanlığımı yürüten ve hiçbir konuda yardımını esirgemeyen hocam sayın Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a, tez çalışmam süresince bana destek ve yardımcı olan Mikrobiyoloji bölümü çalışma arkadaşlarıma ve tüm Biyoloji Bölümü'ne, tezimin yazım aşamasında karşılaştığım tüm sorunlarda yanımda olan arkadaşım Arş. Grv. Ümit ÖZYILMAZ'a, olanaklarının tümünü kullanmama izin veren Aydın Ticaret Borsası Müdürlüğüne ve Özel Gıda Laboratuvarı çalışanlarına, istatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Orhan KARACA'ya, destekleri için ADÜ Araştırma Fon Saymanlığına ve her zaman yanımda olduklarını hissettiğim sevgili aileme teşekkür ederim.



KAYNAKLAR

1. Abdollahi, A., Buchanon, R.L., 1981. Regulation of Aflatoxin Biosynthesis: Characterization of Glucose as an Apparent Inducer of Aflatoxin Production. *Journal of Food Science*, 46, 143-146.
2. Adye, J., Mateles, R.I., 1964. Incorporation of Labelled Compounds into Aflatoxins. *Biochim. Biophys. Acta* 86, 418-420.
3. Aksoy, U., H., Hakerler, D., Anaç, M., Düzbastılar, 1987. Germencik Yöresi Sarılop İncir Bahçelerinin Beslenme Durumu ve İncelenen Besin Elementleri ile Bazı Verim ve Kalite Özellikleri Arasındaki İlişkiler, *Tariş Araştırma Geliştirme Müdürlüğü*, Bornova, 34s.
4. Alexopoulos, C.S., Mims, C.W. and Blackwell, M., 1995. *Introductory Mycology*.
5. Altuğ, T., Yousef, A.E. and Marth, E.H., 1990. Degredation of Aflatoxin B₁ in Dried Figs by Sodium Bisulfite With or Without Heat, Ultraviolet Energy or Hydrogen Peroxide. *Journal of Food Protection*, 53(7), 581-582.
6. Anon., 1990. Ege Bölgesinde İncirlerde Aflatoksin ve Ochratoksin Oluşumu ile Önlenmesi Üzerinde Araştırmalar. *Zirai Mücadele Araştırma Projesi*.
7. AOAC Approved Method, 1999. Assigned number 999.07 in May, *Journal of AOAC International* Vol.83. No. 2.2000.
8. Assante, G., Camarda, L., Loci, R., Merlini, L., Nasini, G., Papadopoulos, E., 1981. Isolation and Structure of Red Pigments from *Aspergillus flavus* and Related Species, Grown on a Differential Medium. *J. Agric. Food. Chem.* 29: 785-787.
9. Aşkın, O., Denizel, T., Köşker, Ö., 1977a. Kuru İncir ve Ezmelerinde Bulunan Küflerin İzolasyon ve İdentifikasyonları Üzerinde Araştırmalar. *A.Ü. Ziraat Fak. Yıllığı*, s. 50-63.
10. Aşkın, O., Denizel, T., Köşker, Ö., 1977b. *Aspergillus flavus* ile Aşılanan Kuru İncirlerde Aflatoksin Oluşumu Üzerinde Araştırmalar. *A.Ü. Ziraat Fak. Yıllığı*, 27, 1, 130-144.

11. Aziz, N.H., Refai, M.K., & Abd El-Aal, S.S., 1990. Occurance of Aflatoxin and Aflatoxigenic Moulds in Coffee Beans and Decontamination by Gamma-Irradiation. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*, 49, 951-961.
12. Aziz, N.H., Moussa, L.A., 1997. *Nahrung*, 41, 150-154.
13. Aziz, N.H., 2002a. Influence of Gamma- Irradiation and Maize Lipids on the Production of Aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*.
14. Aziz, N.H., Smyk, B., 2002b. Influence of UV Radiation and Nitrosamines on the Induction of Mycotoxins Synthesis by Nontoxicogenic Moulds Isolated From Feed Samples. 46(2), 118-121.
15. Aziz, N. H., Moussa, L.A., 2002c. Influence of Gamma-Radiation on Mycotoxin Producing Moulds and Mycotoxin in Fruits. *Food Control*, 13, 281-288.
16. Bars, J.L., 1989. Contribution to a Practical Strategy for Avoidance of Aflatoxin in Dried Figs and Aflatoxin Symposium. Çeşme, İzmir.
17. Bata, Á. and Lásztity, R., 1999. Detoxification of Mycotoxin-Contaminated Food and Feed by Microorganisms, *Trends in Food Science&Technology*, 10, 223-228.
18. Beggerman, W.I., 1981. A Modified Rose Bengal Medium for the Enumeration of Yeasts and Molds from Foods. *J. Appl. Microbiol. Biotec.* 12: 242-247.
19. Bennett, G.A., Richard, J.L., 1996. Influence of Processing on *Fusarium* Mycotoxins in Contaminated Grains. *Food Technology*, 50, 235-238.
20. Betina, V., 1989. *Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects*, Elsevier, ISBN 0-444-98885-8, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, p.437.
21. Beuchat, L.R., 1984. Comparison of *Aspergillus* Differential Medium and *Aspergillus Flavus* Parasiticus Agar for Enumerating Total Yeasts and Molds and Potentially Aflatoxigenic *Aspergilli* in Peanuts, Corn Meal and Cowpeas. *J. Food Prot.* 48: 312-315.

22. Bothast, R.J., Fennell, D.I., 1974. A Medium for Rapid Identification and Enumeration of *Aspergillus flavus* and Related Organisms. *Mycologia*. 66: 365-369.
23. Bothast, R.J., Bennett, G.A., Vancauwenberge, J.E., Richard, J.L., 1992. Fate of Fumonisin B₁ in Naturally Contaminated Corn During Ethanol Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 233-236.
24. Buchanan, J.R., Sommer, N.F., and Fortlage, R.J., 1975. *Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Production in Fig Fruits. *Applied Microbiology*, Vol. 30, No.2, p. 238-241.
25. Bullerman, L.B., 1979. Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health: *Journal of Food Protection*, 42(1): 65-86.
26. Cagan, L., Svercel, M., 2001. The Influence of Ultraviolet Light on Pathogenicity of Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European Corn Borer, *Ostrinia Nubilalis* hbn. (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Central European Agriculture*, Volume 2, No. 3-4.
27. Carnaghan, R.B.A, 1965. Hepatic Tumors in Ducks Fed a Low Level of Toxic Groundnut Meal. *Nature (London)*, 208-308.
28. Cemeroglu, B., Acar, J., 1986. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 6,s: 56.
29. Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E. and Hall, H.H., 1966. Microbial Detoxification of Aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14(6), 934-939.
30. Ciegler, A., and Lilehoj, E.B., 1968. Mycotoxins. *Advances in Applied Microbiology*. 155-219.
31. Ciegler, A., 1978. Fungi That Produce Mycotoxins: Conditions and Occurance. *Mycopathologia*, Vol. 65: 5-11.
32. Conzane, R.S., Stenzel W.R., Kroh L.W., 2002. Reducing the Aflatoxin Content in Peanuts. 98 (9), 321-325.
33. Davis, N.D., Iyer, S.K., Diener, U.L., 1987. Improved Method of Screening for Aflatoxin With a Coconut Agar Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1593-1595.

34. De Vogel, P., Van Rhee, R., Koelensmid, W., 1965. A Rapid Screening Test for Aflatoxin-Synthetising *Aspergilli* of the *flavus-oryzae* Group. J. Appl. Bacteriol. 28, 213-220.
35. DİE, 1994. Türkiye İstatistik Yıllığı 1994, Ankara.
36. Diener, U.L., and Davis, N.D., 1966. Aflatoxin Production by Isolates of *Aspergillus flavus*, Phytopathology, 56, 1390-1393.
37. Diener, U.L., and Davis, N.D., 1969. Aflatoxins Formation by *Aspergillus flavus*. Food Science and Technology, Chap. 11, p.13-53.
38. Domsch, K.H., Gams, W., & Anderson, T.H., 1980. Compendium of Soil Fungi. London: Academic Pres.
39. Dyer, S.K., McCammon, S., 1994. Detection of Toxigenic Isolates of *Aspergillus flavus* and Related Species on Coconut Cream Agar. J. Appl. Bacteriol. 76, 75-78.
40. Eaton, D.L. and Groopman, J.D. 1994. The Toxicology of Aflatoxins. Academic Pres, New York. Pp 383-426.
41. Egmond H.P., 1981. Mycotoxins, Sampling and Chemical Detection. Chap. 4, 219-226.
42. Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Quedraogo, A., Vidal, c., Lacey, L.A., Lomer, C.J., Rougier, M., 1996. Variability in Susceptibility to Simulated Sunlight of Conidia Among Isolates of Entomopathogenic Hypomycetes. Mycopathologia, 135(3): 171-181.
43. Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Piva, A. Chies, L. and Galvano, M., 1998. Activated Carbons: In vitro Affinity for Ochratoxin-A and Deoxynivalenol and Relation of Adsorption Ability for Physicochemical Parameters. Journal of Food Protection, 61(4), 469-475.
44. Goldblatt, L.A., and Dollear, F.G., 1977. Detoxification of Contaminated Crops: Mycotoxins in Human and Animal Health. Rodricks, J.V.
45. Groopman, J.D. and Kensler, T.W., 1988. Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer, CRC Critical review in Toxicology, 19(2), 113-145.

46. Gül, N., 1992. Sarılop İncir Çeşidinde Bazı Kuru Meyve Nitelikleri ile Aflatoksin İlişkisi Üzerinde Araştırmalar, Yüksek lisans Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 125s.
47. Hamsa, T.A.P., Ayres, J.C., 1977. A Differential Medium for the Isolation of *Aspergillus flavus* from Cottonseed. J. Food Sci. 42:449-453.
48. Hara, S., Fennell, D.L., Hesseltine, C.W., 1974. Aflatoxin Producing Strains of *Aspergillus flavus* Detected by Fluorescence of Agar Medium Under Ultraviolet Light. Appl. Microbiol. 27, 1118-1123.
49. Hartog, B.J., 1981. The Detection and Quantification of Fungi in Food. Chapter 2, p. 206-211. Ed. by Samson, R.A., Hoekstra, E.S., and Van Oorschot, C.A.N., Introduction to Food-borne Fungi, C.B.S., Baarn, Delft, Institute of the Royal Netherlands.
50. Henson, O.E., 1981. Dichloran as an Inhibitor of Mold Spreading in Fungal Plating Media: Effects on Colony Diameter and Enumeration. Appl. Microbiol. 42: 656-660.
51. Horn, B.W., Grene R.L., Sobolev, V.S., Dorner, C.W., Powell, J.H., Layton, R.C, 1996. Association of Morphology and Mycotoxin Production with Vegetative Compatibility Groups in *Aspergillus flavus*, *A.parasiticus*, and *A.tamarii*. Mycologia; 88: 574-587.
52. Horn, B.W., Dorner, J.W., 1999. Regional Differencies in Production of Aflatoxin B₁ and Cyclopiazonic Acid by Soil Isolates of *Aspergillus flavus* Along a Transect within the United States. Appl. Environ. Microbiol., 65: 1444-1449.
53. ICMSF (The International Comission of Microbiological Specifications for Foods), 1978. Microorganisms in Food 2. University of Toronto Pres, Canada, p. 110-118.
54. Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T., 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, A new Aflatoxin Producing Species in *Aspergillus* Section Flavi, Mycological Research, 105(2), 233-239.
55. İçibal, N., and Altuğ T., 1992. Degredation of Aflatoxins in Dried Figs by Sulphur Dioxide Alone and in Combination With Heat, Ultraviolet Energy or Hydrogen Peroxide. Lebensm.-Wiss.U.- Technol., 25, 294-296.

56. İzmir Ticaret Borsası (İ.T.B.), 1992. İzmir Ticaret Borsası 1992 Yılı İktisadi Raporu, İTB Yayınları, 137s.
57. Jarvis, B., 1971. Factors Affecting the Production of Mycotoxins, J. Appl. Bact., 34, 199-213.
58. Karapınar, M., 1981. Mikotoksinler. E.Ü. Gıda Fak. Dergisi, Sayı.2, 157-170.
59. Karapınar, M., Gönül, M., Gönül, Ş.E., Boyacıoğlu, D., 1989. Ege Bölgesi İncirlerinde Küf Florası ve Aflatoksin Dağılımı. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Çoğaltma Yayın No. 84, Bornova.
60. Kaya, S., Y.Şanlı, 1991. Veteriner Klinik Toksikoloji, Ankara, 282-360.
61. Klich, M.A., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Published by the Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, An Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
62. Koburger, J.A., 1972. Fungi in Foods. IV. Effect of Plating Medium pH on Counts. J. Milk Food Tech. 35: 659-660.
63. Kocabaş, N., 1991. Aflatoksine Duyarlı Bazı Gıdaların Fungal Florası ve Aflatoksijenik Küflerin Saptanmasında Uygun Besiyeri ve İzolasyon Yöntemi Üzerine Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi. Bornova, İzmir.
64. Kurtzman, C.P., Horn B.W., Hesseltine C.W. *Aspergillus nomius*, 1987. A New Aflatoxin-Producing Species Related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol., 1987; 53: 147-158.
65. Lemke, P.A., Davis, N.D., Iyer, S.K., Creech, G.W., Diener, U.L., 1988. Fluorimetric Analyses of Iodinated Aflatoxin in Minicultures of *Aspergillus parasiticus*. J. Ind. Microbiol. 3, 119-125.
66. Lemke, P.A., Davis, N.D., Iyer, S.K., Creech, G.W., 1989. Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1808-1810.
67. Levitin, M., M., Kirsanova, R.V., Yurchenko, L.V., 1971. Genetics and Selection of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., Communication I. Lethal and Mutagenic Effects of Ultraviolet and X-Rays. Genetika, 7(1): 73-79.

68. Lieu, F.Y., and Bullerman, L.B., 1977. Production and stability of Aflatoxin, Penicillic Acid and Patulin in Several Substrates. *Journal of Food Science*, Vol.42, No.5, 1222-1224.
69. Lin, M.T., Dianese, J.C., 1976. A Coconut-Agar Medium for Rapid Detection of Aflatoxin Production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 66, 1466-1469.
70. Mitchell, G.E., 1988. Influence of Irradiation of Food on Aflatoxin Production. *Food Technology in Australia*, 40, 324-326.
71. Molina, M., L., Gianuzzi, 2002. Modelling of Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* in a Solid Medium at Different Temperatures, pH and Propionic acid Concentrations, *Food Research International*, 35, 585-594.
72. Morton, S.G., Eadie, T., and Llwellyn, G.C., 1979. Aflatoxigenic Potential of Dried Figs, Apricots, Pineapples, and Raisins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 62, No. 4, p: 958-962.
73. Mutlu, M, Gökmen, V., 1998. Determination of Effective Mass Transfer Coefficient of Patulin Adsorption on Activated Carbon Packed Bed Columns With Recycling. *Journal of Food Engineering*, 35, 259-266.
74. Müller-Kögler, E., 1965: Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung Zur Biologischen Schadlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. Paul Parey, Berlin und Hamburg, 444 pp.
75. Nelson, F.E., 1971. Plating Medium pH as a Factor in Apparent Survival of Sublethally Stressed Yeasts. *J. Dairy Sci.* 54: 748-749 (Koburger 1972'den alınmıştır.).
76. Northolt, M.D., Van Egmond, H.P., and Paulsch, W.E., 1977. Differences Between *Aspergillus flavus* Strains in Growth and Aflatoxin B₁ Production in Relation to Water Activity and Temperature. *Journal of Food Protection*. Vol. 40, NO. 11, 778-781.
77. Northolt, M.D., and Soentoro, P.S.S., 1981. Fungal Growth of Foodstuffs Related to Mycotoxin Contamination. Chap. 3., 212-218. Ed. By Samson, R.A., Hoekstra, E.S., and Van Oorschot, C.A.N., Introduction to Food-borne Fungi, C.B.S. Baarn, Delft, Institute of the Royal Netherlands.
78. Ordaz J.J., C.A. Fente, B.I. Vázquez, C.M. Franco, A.Cepeda, 2003. Development of a Method for direct Visual Determination of Aflatoxin

- Production by Colonies of the *Aspergillus flavus* Group. International Journal of Food Microbiology, 83, 219-225.
79. Özar, A.İ., P. Önder, A. Sarıbay, S. Özkut, M. Gündoğdu, T. Azeri, Y. Arınç, T. Demir ve H. Genç. 1986. Ege Bölgesi İncirlerinde Görülen Hastalık ve Zararlılarla Savaşım Olanaklarının Saptanması ve Geliştirilmesi Üzerinde Araştırmalar. Doğa Tr.Tar.Or.D.C.: 263-277.
 80. Özey, G., İ. Alperden, 1991. Kuru İncirlerde (*Ficus corina* L.) Aflatoksin ve Okratoksin-A Oluşumu, Gıda Sanayi, 24,57-62.
 81. Öztürk, M., 1995. P53 Mutations in Nonmalignant Human Liver: Fingerprints of Aflatoxins. Hepatology, 21 (2): 600-601.
 82. Park, K.Y., Bullerman, L.B., 1983. Effects of Substrate and Temperature on Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. Journal of Food Protection., Vol.46, No.3, 178-184.
 83. Paster, N., Barkai-Golan, R., & Padova, R., 1985. Effect of Gamma Radiation of Ochratoxin Production by the Fungus *Aspergillus ochraceus*. J. Sci. Food Agric., 36, 445-449.
 84. Paster, N., & Bullerman, L.B., 1988. Mould Spoilage and Mycotoxin Formation in Grains as Controlled by Physical Means. International Journal of Food and Microbiology, 7, 257-265.
 85. Peterson, S., Ito, Y., Horn, B.W. & Goto, T., 2001. *Aspergillus bombycis* a New Aflatoxigenic Species and Genetic Variation in its Sibling Species *A.nomius*. Mycologia 93: 689-703.
 86. Pitt, J.I., 1974. Xerophilic Fungi and the Spoilage of Foods of Plant Origin. (Ed. R.B. Duck-Worth.) Water Relations of Foods. Academic Pres, New York. 273-307.
 87. Pitt, I.J., Hocking, A.D., Glenn, D.R., 1983. An Improved Medium for the Detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. J.Appl. Bact. 54: 109-114.
 88. Pitt, I.J., Hocking, A.D., 1985. Fungi and Food Spoilage, Academic Pres, Sydney.
 89. Raper, K.B., and Fennell, D.I., 1965. The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

90. Refai, M.K., Aziz, N.H., El-Far, F.M., & Hassan, A.A., 1996. Detection of Ochratoxin Produced by *A.ochraceus* in Feedstuffs and Its Control by Gamma Irradiation. Appl. Radiat. Isot., 7, 617-621.
91. Resmi Gazete, 1991. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'ndan : Beyana ve Tescile Tabi Yem Hammaddelerinde ve Karma Yemlerde Bulunabilecek Zararlı Maddelerin En Çok Miktarları Listesi, Tebliğ No: 91714, Resmi Gazete, 05.09.1991, Sayı No: 20982, Ankara.
92. Resmi Gazete, 1997. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına dair Yönetmelik. 23 Eylül 2002 tarih ve 24885 Sayılı Resmi Gazete. 29-40.
93. Rustom, I.Y.S., 1997. Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, Legislation and Inactivation by Physical Methods, Food Chemistry, 59(1), 57-67.
94. Schindler, A.F., Abadie, A.N., Simpson, R.E., 1980. Enhanced Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* and *Asp.parasiticus* After Gamma Irradiation of Spores Inoculum. J. Food Prot., 43, 7-9.
95. Scott, P.M., 1978. Mycotoxins in Feeds and Ingredients and their Origin, Journal of Food Protection, 41(5), 385-398.
96. Seiler, D.A.L., 1985. Monitoring Mycological Media. Int. J. Food Microbiol. 2: 123-131.
97. Smith, N.D., Dawson, V.T., 1944. The Bacteriostatic Action of Rose Bengal in Media Used For Plate Counts of Soil Fungi. Soil Sci. 58: 467-471.
98. Steiner, E.W., R.H., Rieker and R. Battaglia, 1988. Aflatoxin Contamination in Dried Figs. Distribution and Association With Fluorescence. J. Of Agr. And Food Che. 36: 88-91.
99. Stoloff, L., 1977. Aflatoxins- An Overview: Mycotoxins in Human and Animal Health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (eds), Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois, 7-29.
100. Tabata, S., Kamimura, H., Ibe, a., Hashimoto, H., Tamura, Y., 1994. Degredation of Aflatoxins by Food Additives. Journal of Food Protection, 57 (1): 42-47.
101. Topal, Ş., 1986. Gıdalarda Bulunan Önemli Toksik Küfler ve Sağlık Açısından Değerlendirilmesi. Gıda (11), 6, 345-349.

102. Topal, Ş., 1999. Küf Kataloğu ve Mayalar / Bakteriler. TÜBİTAK, MAM Kültür Koleksiyonu, GBTAE, Yayın no: 68.
103. Torrey, G.S., Marth, E.H., 1976. Silica Gel Medium to Detect Molds That Produce Aflatoxin. Appl. Environ. Microbiol. 32, 376-380.
104. Trucksess, M.W., Stoloff, L., and Mislivec, P.B., 1988. effect of Temperature, Water Activity and Other Toxigenic Mold Species on Growth of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Production on Corn, Pinto beans and Soybeans. Jour. Of Food Protect. Vol. 51, No.5, 361-363.
105. Tunail, N., Mikotoksinler, 1990. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. baskı, (Yazarlar: Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, İ., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, A.K., Kaleli, D., Kuleaşan, H, Özkaya, B.F., Tunail, N., Tükel, Ç.), Sim Matbaacılık, Ankara. 116-189.
106. Twomey, D.G., Mackie, D.L., 1985. A Medium for the Rapid Growth and Detection of Moulds. Appl. Microbiol. 1: 105-107.
107. Watanabe, T., 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, second edition.
108. Weckbach, L.S., and Marth, E.H., 1977. Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a Competitive Environment. Mycopathologia, 62, 1: 39-45.
109. Whitaker Thomas B., 2003. Standardisation of Mycotoxin Sampling Procedures: An Urgent Necessity. Food Control, 14, 233-237.
110. Wicklow, D.T., Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., and adams, G.L., 1980. Interference Competition and Aflatoxin Levels in Corn. Postharvest Pathology and Mycotoxins. Vol. 70, No: 8, 761-764.
111. Wilson, D.M., 1988. Potential for Biological Control of *A.flavus* and Aflatoxin Contamination. Chap. 5, 55-66. Ed. By Mukerji, K.G., and Garg, K.L., Biocontrol of Plant Diseases, Vol.2, CRC Pres, Inc., Boca Raton, Florida.
112. Yousef, A.E., Marth, E.H., 1985. Degradation of Aflatoxin M₁ in Milk by Ultraviolet Energy. Journal of Food Protection, 48, 697-698.
113. Youssef, M.B., Mahrous, S.R., & Aziz, N.H., 1999. Effect of Gamma Irradiation on Aflatoxin B₁ Production by *Aspergillus flavus* in Ground Beef Stored at 5 °C. Journal of Food Safety, 19, 231-239.

114. Zeinab, E.M.El-Bazza, Hala, A.F., Mohie, E.D.Z.El-Fouly, Seham, Y.M.El-Tablawy, 2001. Inhibitory Effect of Gamma Radiation and *Nigella sativa* Seeds Oil on Growth, Spore Germination and Toxin Production of Fungi. *Radiation Physics and Chemistry* , 60, 181-189.
115. Zerfiridis, G.K., 1985. Production of Aflatoxins on Inoculated Teleme Cheese. *Journal of Food Protection*, Vol. 48, No.11, 961-964.



ÖZGEÇMİŞ

14.08.1978 tarihinde Aydın'ın Nazilli ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Nazilli Beşeylül ilkokulunda tamamladıktan sonra orta ve lise öğrenimini Nazilli Anadolu Lisesi'nde sürdürdü. 1997 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nü kazandı ve 2001 yılında mezun oldu. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2002 yılında araştırma görevlisi olarak atandı. Halen bu üniversitede görevine devam etmektedir.

