

ÖZET

Bu araştırmada Adana ve ilçelerindeki alabalık üretme çiftliklerinde kullanılan alabalık yemlerinin aflatoksin düzeyleri ve dönemlere göre aflatoksin miktarının değişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Aflatoksinlerle kontamine olmuş yemlerin alabalık yetiştiriciliğinde meydana getirdiği en önemli sorun çok düşük (ppb) düzeylerde bulunması durumunda dahi yemden yararlanmayı azaltması ve büyümede gerilemeye neden olmasıdır.

Alabalık üretme çiftliklerinden toplanan 33 adet yem örneğinde Aflatoksin B₁ ve toplam Aflatoksin (B₁+B₂+G₁+G₂) aranması yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC) ile yapılmıştır. Örneklerin 8 tanesinde Aflatoksin B₁ tespit edilmiştir.

Araştırma sonucu alabalık yemlerinin hiçbirisi ülkemiz aflatoksin limitlerini aşmamaktadır. Bu açıdan ilimiz ve çevresindeki alabalık çiftliklerinde kullanılan yemlerde bir sorun yok gibi görünmektedir.

Şimdilik yasal bir sorun yoktur.

Anahtar kelimeler : Aflatoksin, balık yemi, HPLC, alabalık, IAK.

ABSTRACT

In this study, the aim was to determine the level of aflatoxin and the change in the quantity of aflatoxin according to periods in trout feed used in the trout producing farm in Adana and environs.

The most important problem, which aflatoxin contaminated feed causes in trout producing, is even at very low levels, it reduces the benefit from the feed and causes retrogression in growth.

The search for aflatoxin B₁ and total Aflatoxin (B₁+B₂+G₁+G₂) in 33 feed samples, which were collected from the farms, was done with High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Aflatoxin B₁ was found in 8 of the samples.

The conclusion of the research is that none of the trout feed used in Adana and environs, has aflatoxin over the country limit. It seems there's no problem with the feed in this respect, at least there is not a legal problem.

Key words : Aflatoxin, fish feed, HPLC, trout, IAC

1. GİRİŞ

Doğal kaynaklardaki balık popülasyonlarının azalmasına bağlı olarak balık yetiştiriciliği özellikle son yıllarda tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hızla artmaktadır. Geniş su kaynaklarına sahip olan ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliğinde henüz beklenen düzeyde değildir. Ancak gelişmeler umut vericidir. İlimiz Adana'daki alabalık üretiminin yıllara göre dağılımındaki artış (Çizelge 1) bu gelişmelere küçük bir örnek olabilir. Adana ve ilçelerinde geçmiş yıllara göre artan alabalık üretme çiftlikleri de bu gelişmeleri desteklemektedir.

Çizelge 1.1. Adana ilinde son beş yılın dönemlere göre alabalık üretimi (kg)
(Anonymous, 2004a)

Dönemler	Aylar	1999	2000	2001	2002	2003
1.Dönem	Ocak Şubat Mart	38.740	47.000	62.470	40.050	42.800
2.Dönem	Nisan Mayıs Haziran	82.491	48.050	32.575	36.100	99.500
3.Dönem	Temmuz Ağustos Eylül	23.248	37.840	55.570	39.900	51.358
4.Dönem	Ekim Kasım Aralık	38.200	56.150	47.600	96.858	51.628
	Toplam	182.679	189.040	195.065	212.908	245.286

Artışa paralel olarak balık yemi sanayide gelişmektedir. Bir balık üretme çiftliğinde maliyeti etkileyen temel girdi yem olup, toplam giderlerin % 50-60'ını yem harcamaları oluşturmaktadır. Bundan dolayı bir işletmeden istenilen verimin alınması için kaliteli ve hijyenik yem kullanılmalıdır (Kaymak, 2000).

Yetiştiriciliği yapılacak balık türüne ve yetiştiricilik yapılacak alana göre farklı yemlerin yapılması gerekliliği her geçen gün yem tiplerinde ve yem yapım tekniklerinde de gelişmelere neden olmaktadır. Amaç kaliteli, temiz ve ekonomik üretim için uygun koşulların sağlanması olmalıdır. Çünkü kaliteli yem kaliteli ürün anlamına gelmektedir (Korkut ve ark., 2002).

İşletmede kullanılacak olan yemin depolama koşulları, kullanılma süresi de hastalıklar açısından önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Çünkü yemlerde ve yem ham maddelerinde olan ransidite ve oksidasyonlar sonucu mantarlaşma başlar. Belirli sıcaklık ve nemlilik koşullarında mantarlar mikotoksin üretirler. Böyle hammaddeler karmaya sokulur veya yemler balığa verilirse, çeşitli sağlık sorunları ortaya çıkar (Kop ve Korkut, 2002).

Son yıllarda bir mikotoksin çeşidi olan aflatoksinle kontamine olmuş yemlerin özellikle alabalık yetiştiriciliğinde çeşitli sorunlara yol açtığı, çok düşük düzeyde (ppb = µg/kg) olsa bile aflatoksin içeren yemlerle beslenen balıklarda iştahsızlığa, hastalıklara hatta ölüme bile neden olduğu saptanmıştır. Balık üretim tesislerinde uygun koşullarda (nem, sıcaklık, vb.) depolanmayan yemlerde bir süre sonra küf oluşumu başlayacaktır. Küflü yemlerle alınan aflatoksinler, bağırsaktan emilerek karaciğerde oksidatif metabolitlerine dönüştürülür ve orada birikerek toksikozise neden olur. Bu yemlerin uzun süre alımı sonucunda balıklarda hastalık semptomları ile birlikte aflatoksikozise, balık verimliliğinin düşmesine ve toplu ölümlere yol açabilir (Şahin ve Korukluoğlu, 2000).

Araştırmacılar tarafından toksini üreten küfün *Aspergillus flavus* olduğu tanımlanmış ve küfün ismine ithafen *Aspergillus*'un (**A**) harfi ve *flavus*'un (**fla**)'sı alınıp **toksin** sözcüğü ile birleştirilerek **Aflatoksin** adı verilmiştir.

(*Aspergillus flavus* + **toksin** -----→ **Aflatoksin**)

Besin veya besin hammaddelerinin hasat veya işlenmesi sırasında veya sonrasında küf gelişmesiyle ortaya çıkan en önemli ve en fazla korkulan mikotoksinlerdir. İlk kez oluşturunca küf türü olarak belirlenen *Aspergillus flavus* türünden adını alan bu toksinler, *Aspergillus parasiticus* türü tarafından da oluşturulabilmektedir. Aflatoksinlerin 18 türü vardır. B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ tipleri en bilinenleridir. Bu tipler arasında en etkilisi Aflatoksin B₁' dir (Şahin ve Korukluoğlu, 2000).

Özellikle ABD'nin güneydoğusunda ortaya çıkmalarından dolayı buradaki tarımsal alanlar rutin olarak aflatoksin için gözlemlenmektedir. FDA yağ çekirdeklerinde, mısırdaki ve yem maddelerinde aflatoksin kontrolü için sıkı kuralları koymaktadır ((Heperkan, 2003). Yem maddeleri ve yemlerde yalnızca AFB₁ dikkate alınmıştır. Yavru hayvanların karma yemlerinde genelde ergin hayvanların yemlerinde öngörülen sınır değerlerin yarısına izin verilmiştir (Tunail, 2000).

Avrupa Birliği'ne üye ülkelerin saptadıkları aflatoksin sınır değerleri de kendi aralarında farklılıklar göstermektedirler. Bu ülkelerin bir kısmı sınır değerleri tüm gıdalar için verirken, bir kısmı da gıdaları gruplandırarak veya süt ürünlerini kendi içlerinde ayırarak sınır değerleri belirlemişlerdir. Sınır değerler tartışılabilir ve gerektiğinde değiştirilebilir değerlerdir. Önemli olan uluslararası gıda ve yem ticaretinde ortak normlara yaklaşılmaması, ticarete rekabet koşullarının bozulmasının önlenmesi ve tüketicilerin korunmasıdır (Anonymous, 2003).

Ülkemizin subtropik iklim kuşağında yer alan Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sıcaklığın ve nemin aflatoksin oluşturması riski bulunmaktadır.

Bu nedenle Adana ve ilçelerinde belirlediğimiz balık üretim tesislerinde kullanılan yemlerde aflatoksin araştırması amacıyla kurgulanan bu araştırma, uygulamaya yönelik olmasının yanı sıra bölgemizde konuyla ilgili olarak yapılan ilk çalışma olması yönüyle de dikkat çekmektedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Balıklar üzerinde aflatoksinlerin etkisini araştıran çalışmalar, 1960 yılında gökkuşağı alabalığında görülen karaciğer kanseri vakaları ile başlamıştır. 1960 yılında birçok ülkede gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde görülen karaciğer kanseri vakalarından sonra olası bir etmen olarak pamuk tohumu küspesi düşünülmüştür. Başlangıçta pamuk tohumu küspesinin rasyondan ayrılması ile kanser oluşumunun azaldığı görülmüştür (Kaymak, 2000). Daha sonra Sinhuber ve arkadaşları (1968a), tarafından yapılan araştırmalarda pamuk tohumu küspesinin o yıllarda İngiltere’ de hindilerde büyük çapta ölümlere yol açan yem rasyonunda da bulunduğu belirlenmiş ve balıklardaki karaciğer kanseri pamuk tohumu küspesinden değil, pamuk tohumu küspesinde bulunan *Aspergillus flavus* tarafından üretilen aflatoksin B₁ olarak adlandırılan bir floresans maddeden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Sinhuber ve ark.(1968b), gökkuşağı alabalığının mikotoksinlere, özellikle aflatoksin B₁’ in hepatokarsinojenik etkisine duyarlılığını tespit amacı ile yaptıkları çalışmada; gökkuşağı alabalığının aflatoksinlere çok duyarlı olduklarını, diyetteki 1 ppb’ den düşük düzeydeki aflatoksin B₁’in bile büyümede yavaşlamaya, yem alımında azalmaya neden olduğunu, diyetle 8-20 ppb düzeyinde aflatoksin B₁ bulunduğu takdirde ise 4-6 ay içinde büyümenin yavaşladığını, ölüm oranında artış gözlemlendiğini ve gözle görülebilir düzeyde hepatoma meydana geldiğini saptamışlardır.

Halver (1968), Aflatoksin B₁’in gökkuşağı alabalığında karaciğer kanseri yapıcı bir etkiye sahip olduğunu belirlemiştir.

Bailey ve ark. (1988), gökkuşağı alabalığının, aflatoksinlerin DNA’ya bağlanma durumunu inceleyerek, aflatoksin ve aflatoksikolün farklılığını incelemişlerdir. Bu amaçla, iki farklı yol izlenmiş, birincisinde aflatoksinler embriyoya direkt enjekte edilmiş, ikincisinde balıklara yemle verilmiştir. Sonuçlar değişik uygulama yollarının, iki aflatoksinin karsinojenite oranlarını da değiştirdiğini, buna karşın her iki aflatoksinin tümör başlatmada eşit ölçüde etkili olduğunu, her iki aflatoksinin de baskın şekilde karaciğer ve kolon kanserini gösteren fenotipik değişikliklere ve tümöre yol açtığını gözlemlemişlerdir

Hendricks ve Barley (1989) yaptıkları bir çalışmada, gökkuşağı alabalığının bir yıl boyunca AFB₁'li yemlerle beslendiklerinde hepatik tümörlerin oluştuğunu, karaciğerin zarar gördüğünü, solungaçların solgun bir renk aldığını ve kandaki kırmızı kan hücrelerinin konsantrasyonlarının azaldığını tespit etmişlerdir ve çalışmalarını devam ettirerek coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) ve sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*)'unda aflatoksin zehirlenmelerinin gökkuşağı alabalığına göre oldukça az hassasiyet gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Şanlı (1989) yaptığı araştırmada normal çevre sıcaklıklarına karşı oldukça dayanıklı olan aflatoksinlerin ancak 300 °C'nin üzerinde tamamen parçalanabildiğini bildirmiştir. Besin ortamındaki aflatoksin içeriğini tamamen etkisiz kılacak fiziksel, kimyasal ve biyolojik yok etme yöntemlerinin hemen hemen hiç olmadığını, bu nedenlerden dolayı her aşamada mikotoksin bulaşmış karma yemlerin hayvan sağlığı için ciddi sorunlar oluşturduğunu tespit etmiştir.

Nakatsuru ve ark. (1990a) tarafından, gökkuşağı alabalığına aflatoksinlerin etkilerini tespit amacıyla yapılan bir çalışmada; gökkuşağı alabalığını 1-5-10-20 ve 30 gün süre ile 20 ppb aflatoksin B₁ içeren yemle beslenmişler ve 12 ay sonra sırasıyla % 3, % 12, % 10, % 40 ve % 36 oranında hepatoma belirlemişlerdir. Ayrıca yine bu çalışmada, diyetteki 0,4 ppb gibi düşük bir düzeydeki aflatoksin B₁ içeren diyet ile uzun süre beslenen gökkuşağı alabalıklarında, önemli oranda karaciğer kanseri görüldüğünü bildirmişlerdir.

Nakatsuru ve ark. (1990b) tarafından yapılan bir başka çalışmada, yine gökkuşağı alabalıklarının, aflatoksinlere karşı duyarlılığını tespit amacı ile 0,4 µg/kg aflatoksin B₁ içeren bir diyetle balıkların uzun süre beslenmesi sonucunda; karaciğer hücrelerinde nekroz, pankreas dokularında ve böbreklerde dejenerasyon oluştuğunu, karaciğerde rengin solgunlaştığını, eritrosit, lökosit sayılarının azaldığını, hematokrit ve hemoglobin değerlerinin düştüğünü saptamışlardır. Bu çalışmada gökkuşağı alabalığının, aflatoksin B₁ için 10 günlük oral LD₅₀ değerini 0,5 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemişlerdir.

Nakatsuru ve ark. araştırmalarında (1990c), Salmonidae familyasına ait türler arasında, aflatoksinlere olan duyarlılığı karşılaştırmak için gökkuşağı alabalığı ve

Coho salmonun karaciğerinden ekstrakte ettikleri DNA'ları aflatoksin B₁ ile işleme tabi tutmuş, sonra aflatoksinlerin DNA'larla bağlanma oranları yönünden bu iki balığı karşılaştırmışlardır. Gökkuşaağı alabalığında DNA bağlanmasında yüksek bir oran gözlenirken, Coho salmonunda önemli ölçüde daha düşük düzeyde DNA bağlanmasına rastlanmıştır. Araştırmacılar, gökkuşaağı alabalığının mikotoksinlerin karsinogenik etkisine, Coho salmonuna göre çok daha hassas olmalarını dikkate alarak mikotoksinlerin karsinogenik etkisine duyarlılık ile DNA bağlanma düzeyleri arasında direkt bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Lowell (1992), 10 haftalık bir deneme süresince kanal kedi balığını 6600 ppb AFB₁'li yemle beslediğinde hematokrit ve hemoglobin konsantrasyonlarında azalma görüldüğünü belirlemiştir.

Nigethe ve ark. (1992a), gökkuşaağı alabalığında mikotoksin dispozisyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada, oral yolla alımdan sonra yüksek oranda absorbe edilmenin söz konusu olduğunu ve en yüksek konsantrasyona karaciğerde ulaşıldığını belirlemişlerdir.

Nigethe ve ark. (1992b), gökkuşaağı alabalığı ile tilapiya arasında, oral olarak alınan ³H-AFL B₁ (Tritiatet aflatoksin B₁)'in, hepatik konsantrasyonlarında tür farkını araştırmışlardır. Çalışmada 200 ± 20 g ağırlığında tilapiyalar ve gökkuşaağı alabalığı kullanılmış, spesifik konsantrasyonu 20 ci/mmol olan Tritiatet ³H -AFB₁ son konsantrasyonu 0,17 uci/ul olacak şekilde mısır yağı içerisinde çözündürülerek abdomen içine enjekte edilmiştir. Uygulanan doz, (1mci/kg) gökkuşaağı alabalıklarına uygulanan doz ile aynıdır. Balıkların belirli sürelerle uygulanan dozlardan sonra karaciğer hücrelerindeki radyoaktiviteleri ölçülmüştür. Karaciğerdeki radyasyon konsantrasyonları, tilapiyada gökkuşaağı alabalıklarına göre önemli ölçüde düşük bulunmuş, iki türün kan konsantrasyonları birbirine oldukça benzer olduğundan, bu durum gastrointestinal absorpsiyon derecesindeki veya eliminasyon arasındaki farklara bağlanmamıştır. Alımdan bir gün sonra gökkuşaağı alabalıklarında, karaciğerdeki radyoaktivite, kandakinden 40 kat daha yüksek bulunmuş, tilapiyada ise karaciğerdeki radyoaktivite kandakinin sadece 6 katı olmuştur. Tilapiyanın

aflatoksine alabalık kadar duyarlı olmadıkları fakat tilapiya için de önemli bir sorun olduğu tespit edilmiştir.

Hussain ve ark. (1993), *Stizostedion viterum*'un kaslarındaki toksin kalıntıları ve balık ölümlerine, yemlerindeki aflatoksinin etkisini araştırmışlardır. Balıkları; her biri 12 balıktan oluşan 3 gruba ayırmışlar. 1. grup kontrol örneği olmuş, 2. gruba 50 ppb, 3. gruba ise 100 ppb toksin içeren yemleri 30 dakika boyunca vermişlerdir. Balıklar havalandırma ve katı atık filtre sistemli cam akvaryumlarda tutulmuş, ölüm ve hastalık oranları gözlemlenmiştir. Her gruptaki 6 balık 30 dakika sonra öldürülerek dokularda gelişebilecek olası histopatolojik değişiklikler araştırılmıştır. Ayrıca balık kaslarındaki aflatoksin düzeyi analiz edilmiştir. 48 saat içerisinde aflatoksinle kontamine edilmiş yemlerle beslenen her iki grup balıkta karaciğerde solgunlaşma ve önemli dejeneratif bozulmalar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu iki grup balığın kaslarında 5, 10, 15, 20 ppb düzeyinde aflatoksin B₁, G₁, G₂ tespit edilmiştir. 2 hafta sonra yapılan geri alma çalışmalarında ise balık kaslarında aflatoksine rastlanmazken, belirgin histopatolojik lezyonlar olduğunu saptamışlardır.

Curtis ve ark. (1995), tarafından canlı ağırlığı 4.5 gr olan gökkuşağı alabalığını bir ay boyunca 11 °C, 18 °C ve 14.5 °C sıcaklıkta beslemişlerdir. Bu sürenin sonunda, 0,08 – 0,12 ppm aralıklarında aflatoksin B₁'i banyo yoluyla 30 dakika süreyle uygulamışlardır. 8 aylık besleme sonunda en düşük düzeyde tümör düşük sıcaklıkta beslenen grupta olduğunu saptamışlardır.

Galvano ve ark. (1996), yaptıkları çalışmada Aflatoksin B₁'in karaciğerde mikrozomal-oksidaz enzim sistemi ile metabolize edildiğini, DNA ve proteinlere kovalent bağlarla bağlanarak, oldukça reaktif 8-9 epoksi aflatoksin oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Vidyasagar ve ark. (1997), Aflatoksin B₁'in karaciğerde biyotransformasyona uğrayarak, kanserojenik ve mutajenik bir özellik kazandığını belirlemişlerdir.

Doyle ve ark. (1997) 'nın yaptığı bir çalışmada 8-9 epoksi aflatoksin reaktif grubunun, transkripsiyon prosesini bozarak mutajenik ve kanserojenik bir etkiye neden olduklarını saptamışlardır.

Aynı araştırmacılar, Aflatoksin B₁'in çeşitli enzimleri inhibe ederek ATP üretimini azalttıklarını belirlemişlerdir.

Orner ve ark. (1998), alabalıklarda dehidroepiandrosterone (DHEA)'un aflatoksin B₁'in karsinojenik etkisini artırıp artırmadığını araştırdıkları çalışmalarında; alabalıkları aynı sayıda balık içerecek şekilde 2 gruba ayırarak, 10 ppb Aflatoksin B₁ içeren su banyosunda 3 ay süreyle tutmuşlardır. 3 ay sonunda bir grubu 444 ppm DHEA içeren bir yem rasyonu ile, diğer grubu ise kontrol yemiyle (DHEA içermeyen) beslemişlerdir. 7 ay boyunca sık sık örnek alarak tümör oluşumunu incelemişlerdir. Kontrol balıklarının hiçbirinde 7 ay boyunca tümör tespit edilmemiştir. DHEA içeren diyetle beslenen balıklarda ilk tümör deney başlangıcından sonra 5. ayda (DHEA ile beslemeye başladıktan 2 ay sonra) belirlenmiştir. DHEA ile 6 ay süreyle beslenen balıklarda %20 oranında tümör oluşumu olduğu tespit edilmiş, diğer gruplarda ise tümör oluşumu görülmediğini saptamışlardır. Çalışma sonunda DHEA'nın AFL B₁'in karsinojenik etkisini arttırdığını bulmuşlardır.

Wang ve Groopman (1999), aflatoksinlerin karaciğerde oluşturduğu epoksi formun, DNA ile birleşerek aflatoksin B₁-N7-Guanine kompleksini oluşturduğunu ve Aflatoksin B₁-nükleik asit kompleksinin, karaciğer kanserine yakalanma riskini 2-3 kat arttırdığını tespit etmişlerdir.

Cengizler (2000) balık yemlerindeki ppb düzeylerindeki aflatoksinlerin malign tümörlere neden olduğunu bildirmiştir.

Şanlı (2000) yaptığı araştırmada özellikle hayvan beslemede yoğun olarak kullanılan mısır, buğday, pamuk tohumu küspesi, soya fasulyesi küspesi, ayçiçeği tohumu küspesi, hayvansal kökenli girdiler (et-kemik unu, balık unu) ve karma yemlerin 24-25° C çevre sıcaklığında ürünün nem içeriğine göre, 3-4 gün içerisinde yoğun bir küflenmeye maruz kalabildiğini, küf olgusuna neden olan mantar sayısı veya koloni genişliğiyle aflatoksinlerin oluşma düzeyleri arasında doğrusal bir ilişki olmadığını saptamıştır. Genellikle ürünün ve ortamın giderek azalan nem içeriği, kullanılabilir besin madde kompozisyonu, aşırı sporlanma, küflenme süresi ve iklim koşulları aflatoksin oluşum düzeyini sınırladığını tespit etmiştir. Bu nedenle ağır bir biçimde küflenmiş yemlerde 0,01-15,000 ppm arasında aflatoksin bulunabilirken,

dikkati çekmeyecek düzeyde ve az küflü ürünlerde 1000 ppm'e kadar aflatoksin B₁ (AFB₁) bulunabildiğini saptamıştır.

Kaymak (2000) yaptığı araştırmada, 2000 yılında Türkiye'deki balık yemi üreten yem fabrikalarından alınan alabalık yemlerini aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ düzeyleri yönünden incelenmiştir. Çalışmada 8 ay boyunca 2'şer aylık periyotlarla Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde bulunan alabalık yemi üreten yem fabrikalarındaki değişik üretim devrelerine ait alabalık yemlerinden alınan numuneleri IAK (immunoaffiniti kolon) yöntemiyle, HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) kullanılarak analiz etmiştir. Sonuçlar dönemsel farklılıklara göre de değerlendirilmiştir. Analiz edilen 59 adet yem numunesinden 29'unda (%49,1) 0,48 – 3,46 ppb düzeylerinde toplam aflatoksin bulmuştur. Ancak pozitif örneklerden hiçbirinin ülkemiz aflatoksin limitlerini aşmadığını bildirmiştir. Ayrıca çalışmada alabalık yeminin aflatoksinleri oluşturan *Aspergillus flavus* için uygun bir vasat olup olmadığını tespit etmek amacıyla alabalık yemi örneği yeterli ölçüde nemlendirildikten sonra *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 suş'u ile aşılınarak ve 28 °C'de 20 gün inkübasyondan sonra aflatoksin yönünden analiz etmiştir. Bu denemenin sonucunda, alabalık yemlerinde *Aspergillus parasiticus*'un gelişebildiği ve toksin oluşturabildiğini saptamıştır.

Lee ve ark. (2001), balık ve kuşlar üzerine yaptıkları çalışmalarında aflatoksin'in karaciğerde aflatoksin B₁-8,9-epoksite dönüşümünde sitokrom p450 enziminin sorumlu olduğunu belirlemişlerdir.

Arana ve ark. (2002), yaptıkları araştırmada triploid alabalıkların birçok hastalığa ve bazı ters su kültürü şartlarına karşı diploid alabalıklardan daha dayanıklı olduklarını tespit etmişlerdir. Balık yemlerinin aflatoksinle kirlenmesi gibi yaygın problemleri dikkate alarak bu araştırmanın amacının, aflatoksin B₁ ile kronik kirliliğe maruz kalan triploid ve diploid alabalıkların (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer lezyonları ve büyüme performanslarını karşılaştırmak olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmalarında toplam 240 balıktan oluşan, yemlerinde aflatoksin olmayan diploid ve triploid alabalıkların oluşturduğu kontrol grubu ile yemlerinde 80 ppb aflatoksin /kg olan diploid ve triploid alabalıkların oluşturduğu deney grubu ile 4 grup oluşturmuşlardır. Büyüme performansı ile ilgili karşılaştırma analizleri

kontrol grubu ve deney grubu diploidler arasında önemli bir farklılık göstererek aflatoksin B₁'in diploid alabalıklarda büyümeyi etkilediğini saptamışlardır, Triploid gruplarda ise etkilemediğini belirlemişlerdir.

Altuğ ve Beklevik (2003) farklı kaynaklardan sağladıkları balık yemlerinde, insan ve hayvanlar için toksik metabolitler olan aflatoksin düzeylerini belirlemek amacı ile aflatoksin analizleri yapmışlardır. Çalışmalarında, 1998, 1999, 2000 yıllarında balık üretim işletmeleri, yem fabrikaları ve yurtdışı kaynaklı yemlerden oluşan 85 adet örnek kullanmışlardır. Analizlerde ince tabaka kromatografisi ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) kullanmışlardır. Analizler sonucunda, 85 adet örnekten 20'sinde, 21,2 – 42,4 ppb aralığında total aflatoksin tespit etmişlerdir. 22 adet örnekte 5,0 – 20,0 ppb aralığında total aflatoksin tespit edilirken, 43 adet örnekte önemli düzeyde aflatoksin'e rastlamamışlardır. 20 ppb'nin üstünde total aflatoksin belirlenen örneklerde aflatoksin B₁ analizleri yapıldığında, total aflatoksin miktarının tamamına yakınının 18,4 – 42,4 ppb aralığında bulunan Aflatoksin B₁ den oluştuğunu saptamışlardır. Yem türlerine göre aflatoksin kalıntısı dağılımında istatistiki olarak önemli bir fark olmadığını belirlemişlerdir. Ancak balık üretim işletmelerinden sağlanan (depolanan) yemlerde aflatoksin düzeylerinin, fabrika kaynaklı ve yurtdışı kaynaklı yemlere göre daha yüksek bulunduğunu tesbit etmişlerdir.

Murjani (2004)' nin bir çalışmasında Hindistan'da tüketimde çok tercih edilen ve aflatoksin tarafından dokuları çok fazla zarara uğratılan *Labeo rohita* kullanılmıştır. Bunun için vücut ağırlığı 200 ± 5 gr arasında olan 96 balık seçilip, dört gruba ayrılmıştır: 1. , 2. ve 3. gruplara AFB₁ enjekte edilmiş, 4. Grup kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Histopatolojik ve ultrastructural çalışmalar ile, balığın farklı dokularındaki hasarlar tespit edilerek, bu dokulardaki hasarların yüzdesi belirlenmiştir.

Royes ve Yanong, (2004a) Nil tilapia (*Oreochromis niloticus*)' sıyla ilgili çalışmalarında 75 gün boyunca AFB₁'in milyarda 1.800 bölümünü (ppb) içeren besinlerle beslenen tilapianın büyüme oranlarının azaldığını göstermişlerdir (75 gün için yemin bir milyon kg'ındaki AFB₁'in 1.800 gr'ına eşit). Bunun yanı sıra karaciğerdeki doku anormallikleri ve lezyonlar kanser başlangıcının bir göstergesi

olmuştur. Akıntı sistemleri olan suda 25-30 ppb aflatoksin varlığı herhangi bir ölüme neden olmadan büyümeyi azaltmıştır. Fakat kafes kültüründe 5 ppb'den yüksek aflatoksin yoğunluğunun ölüm oranlarını artırdığını saptamışlardır.

Royes ve Yanong, (2004b), Aflatoksin B₁ (AFB₁)'in hayvanlarda kansere neden olan en yaygın ve doğal olarak ortaya çıkan bir madde olduğunu ve balık sağlığını etkileyen ilk aflatoksikozis vakasının 1960'lar da Güney Amerika'da görüldüğünü belirtmişlerdir. Aflatoksin bulaşmış olan ve çığitle hazırlanan yemlerle beslenen çelikbaş alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer tümörleri oluştuğunu ve bu çiftliklerde balıkların % 85'ine varan bir bölümünün öldüğünü belirlemiş, her ne kadar çığit yemlerde temel bir madde olarak kullanılmasa da diğer yem maddelerinin kötü bir şekilde depolanmasının aflatoksinden etkilenmeye yol açabildiğini tespit etmişlerdir.

Royes ve Yanong, (2004c), çelikbaş alabalıkların AFB₁'e son derece hassasken, kanal yayınbalığı (*Ictalurus punctatus*)'nın AFB₁'e karşı daha az tepki verdiğini saptamışlardır. 15 ay boyunca 0,4 ppb AFB₁ içeren besinlerle beslenen çelikbaş alabalığının tümör gelişme olasılığı % 14 olarak bulunmuştur. Alabalığı 8 ay boyunca 20 ppb AFB₁ içeren besinlerle beslemek karaciğer tümörü oluşumunu % 58' e çıkarmıştır ve 12 ay boyunca bu şekilde beslemek % 83 tümör vakasına neden olduğunu saptamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Balık yemleri

Çizelgede 3.1’de isimleri verilen alabalık üretme çiftliklerinden altı aylık süre boyunca alınan örnekler yem materyalini oluşturmuştur.

Yemlerin analizlerinin yapılabilmesi ve tam bir homojenizasyon sağlanması için en az 500 gram alınması gerektiği belirlenmiştir. Balık yemleri 10, 20 ve 30 kg’lık orijinal ambalajlarından iyice karıştırılarak naylon poşetlere alınmıştır. Naylon poşetlere alınan yemler güneş ışığından zarar görmemeleri için ikinci defa siyah poşetler içerisine konulmuştur. Aksi takdirde güneş ışığı aldıklarında yapıları parçalanarak bozulmaktadır.

Alınan her bir yem örneği için orijinal ambalajında bulunan ve yemin içeriği, miktarı, son kullanma tarihi, üretici firma, ...vb. gibi gerekli bilgileri içeren etiketleri de alınmıştır.

Küfler genelde ılıman sıcaklık derecelerini tercih ederler. En iyi gelişimlerini ve faaliyetlerini 20°C ve 35°C arasındaki sıcaklıklarda geliştirmektedirler.

Adana ve ilçelerindeki tespit edilen alabalık üretme çiftliklerinden aldığımız yemler için belirlediğimiz aylar özellikle sıcaklık ve nemin yüksek olduğu aylardır. Bununla birlikte özellikle Ekim, Kasım ve Aralık aylarında yağmurların yağması nem oranını yükseltmiş, bunun sonucunda da bu aylarda yapılan analiz sonuçlarında en yüksek aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin değerleri tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1. Yem Örneklerinin Alınma Programı

Örnek alınan tesis / çiftlik	Yem	Yem (mm)	Aylar					
			Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
Çukurova su ürünleri işl. Acarantaş Köyü/Kozan	Pelet besi	2						1
Çukurova su ürünleri işl. Dörtağaç Köyü / Adana	Pelet besi	6		1				
Yaşar Öz Alb. İşl.	Pelet besi	4 -5			1	1		
Aşçıbekirli Köyü / Pozantı	Ekstrüzyon	2-5 3-8			3	2		
Ç.Ü.Su Ür. Fak. Balcalı	Pelet besi	2		1				
DSİ Alb. Üretim Çiftliği	Pelet besi	3			1			
Eğner Alb.İşl Karabucak Köyü /Kozan	Ekstrüzyon	2 –6 8		3				
Eğner Alb.İşl Eğner Köyü /Aladağ	Pelet besi	3						
Kılıçlı Alabalık Acarantaş Köyü / Kozan	Pelet besi	3						1

Çizelge 3.1' in devamı

Kilgen Alabalık İşl. Kozan Baraj Gölü / Kozan	Ekstrüzyon	0.5 -6 8				2		1
Salim Todil Alabalık İşl. Gürümze Köyü / Feke	Ekstrüzyon	2						1
Elif Kara Alb. Ürt.Tesisleri Şarşar Mevki / Kayadibi Saimbeyli	Ekstrüzyon	2.5						1
Albal Su Ürünleri : 1. Yardibi Köyü / Saimbeyli 2. Şarşar Mevki / Kayadibi Saimbeyli	Ekstrüzyon	2 -3 4 -5	3					1
	Granül	0.5						1
Sarıpınar Alb. Ürt. Çift. Gürümze Köyü / Feke	Ekstrüzyon	2 -3 4	2				2	
Bardakgözü Alb. Ürt. Çift. Gürümze Köyü / Feke	Pelet besi	4					1	
	Ekstrüzyon	2 -5					2	

3.1.2. Analiz Yeri ve Zamanı

Analizler 2004 yılı Temmuz ve Aralık ayları arasında T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Adana İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğü Mikotoksin Laboratuvarında (AİKLM) yürütülmüştür.

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Derin Dondurucu : Balık yemlerinin ve analiz standartlarının muhafaza edilmesi amacı ile kullanılmıştır.

Blender : Alınan yem örneklerinin öğütülmesi ve kullanılan kimyasallarla homojen hale getirilmesi için yüksek devirli blender kullanılmıştır.

Teraziler : Yem örneklerinin ve kimyasal maddelerin tartılmasında 0.01 ve 0.001 g hassasiyette dijital teraziler kullanılmıştır.

İmmunoaffinity kolon : Antijen ve antikor reaksiyonları teknolojisine göre aflatoksinler için özel antikorlarla üretilmiş hazır kolonlar olup, ekstraksiyon işleminde kullanılmıştır. (Şekil 3.1)

Oto sampler : İçinde eluat olan viallerin buraya yerleştirilmesi ile eluatın enjeksiyonunun otomatik olarak HPLC cihazına yapılmasında kullanılmıştır.

HPLC Likit kromatografi cihazı : Kolondan geçirilerek vialle alınan numune ekstraktının enjeksiyonu yapılarak miktar tayininin elde edilmesinde kullanılmıştır.

Azot gazı ve azot tüpleri : Analiz standartlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Kobrasel : Türevlendirmede kullanılmıştır.

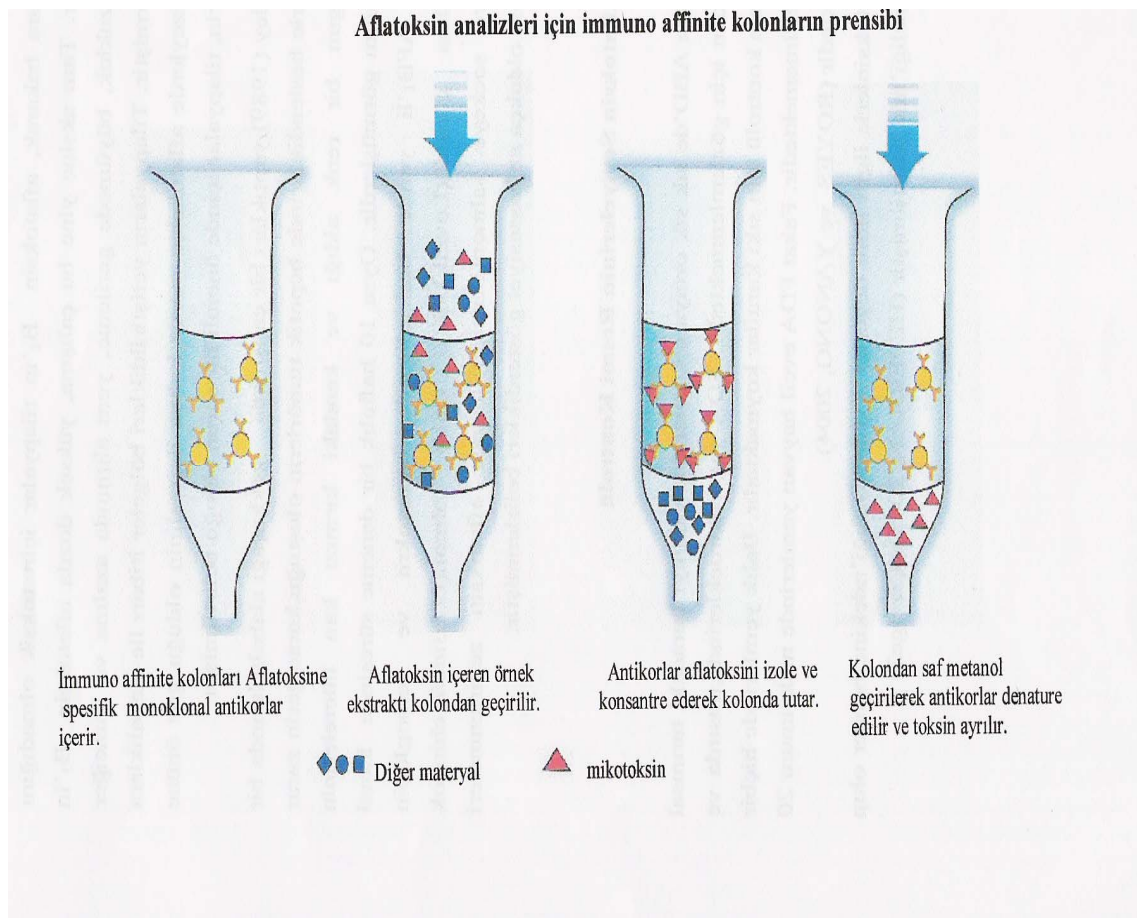
Vortex : Analiz standartlarının ve eluatların vialler içerisinde homojen bir şekilde karıştırılması amacı ile kullanılmıştır.

Filtre kağıtları:

- a . Kaba filtre kağıdı
 - b . Cam mikro fiber filtre kağıdı
- Süzme amacıyla kullanılmıştır.

Diğer alet ve cihazlar

Otomatik pipetler, cam mezür, erlen ve huni, 2 ml ve 5 ml'lik vialler, plastik enjektörler.



Şekil 3.1. İmmuno affinite kolonun yapısı (Anonymous, 1999)

3.2. Yöntem

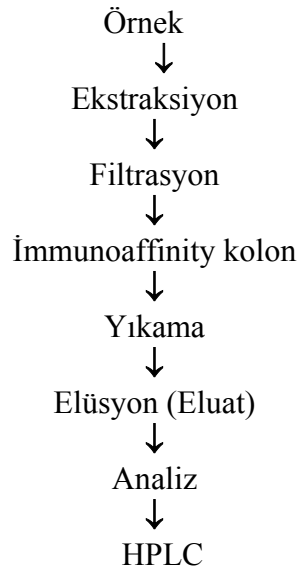
3.2.1. Analiz örneklerinin hazırlanması

Aflatoksin analizlerinde temel kural analiz numunesinin tane iriliğinin yeterince küçük olması ve numunenin yeterince homojen hale getirilmesidir. Bu nedenle analiz için alınan pelet yemler analiz edilmeden önce uygun bir değirmende öğütülerek homojen hale getirilmişlerdir.

3.2.2. Analiz yöntemi

Aflatoksin analizleri IAC-HPLC-FD'e göre yapılmıştır (Vicom 1999). Bu yöntemin tespit limiti 0.2 ppb'dir.

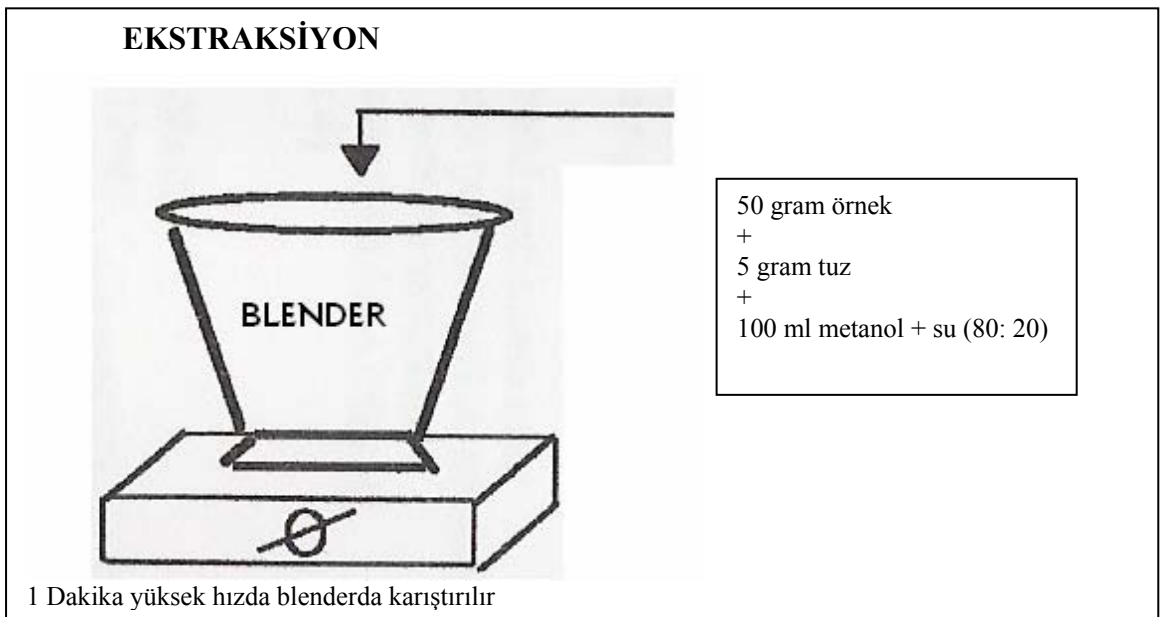
3.2.2.1. Analiz yönteminin prosedürü (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Analiz yönteminin prosedürü (Anonymous, 1999)

3.2.2.2.Numune Ekstraksiyonu

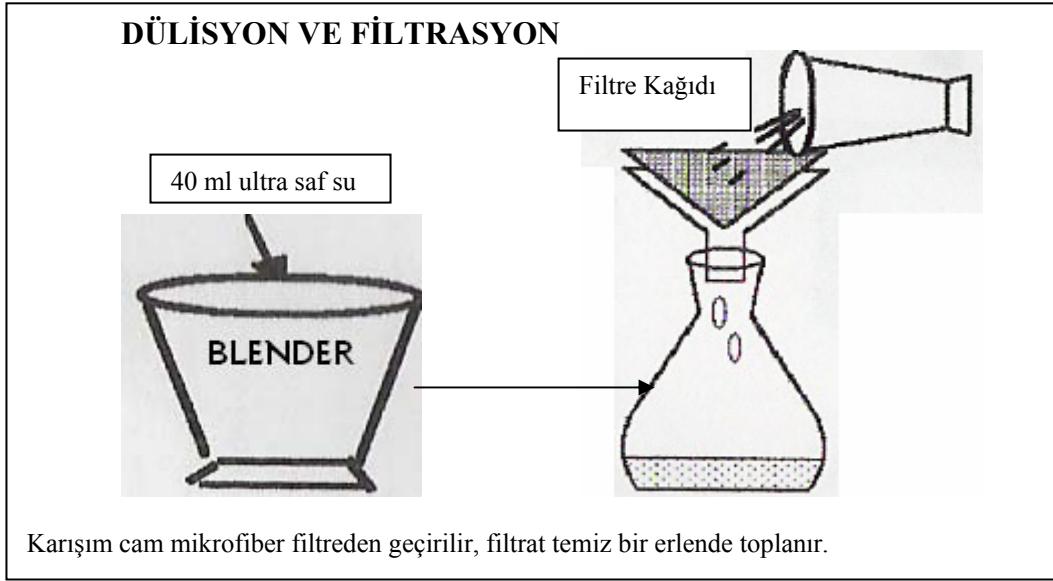
Öğütülerek homojen hale getirilmiş numuneden 50 gr blender kabına aktarılmış ve üzerine 5 gr sodyum klorür ile 100 ml metanol : su (80:20) karışımından ilave edilerek blender kapağı kapatılmış ve 1-2 dakika yüksek hızda karıştırılmıştır. Numune ekstraktı katlı filtre kağıdından geçirilip, filtrat temiz bir mezürde toplanmıştır (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. Numunenin Ekstraksiyonu (Anonymous, 1999)

3.2.2.3.Ekstrakt seyreltme

Katlı filtre kağıdından geçirilip bir mezürde toplanmış olan ekstratın 10 ml'si temiz bir mezüre alınmıştır. Üzerine 40 ml ultra saf su ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Karışım ikinci kez cam mikrofiber filtreden geçirilip, filtrat temiz bir mezürde toplanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Numunenin Seyreltilmesi (Anonymous, 1999)

3.2.2.4.İmmuno affinity kolonun şartlandırılması

İmmuno affinite kolon kullanılmadan yarım saat önce buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Oda sıcaklığına geldikten sonra kolonun üst tıpası çıkarılarak ucu kesilmiştir ve içindeki sıvı yavaş bir şekilde boşaltılmıştır.

3.2.2.5.Immuno affinity kolon uygulaması

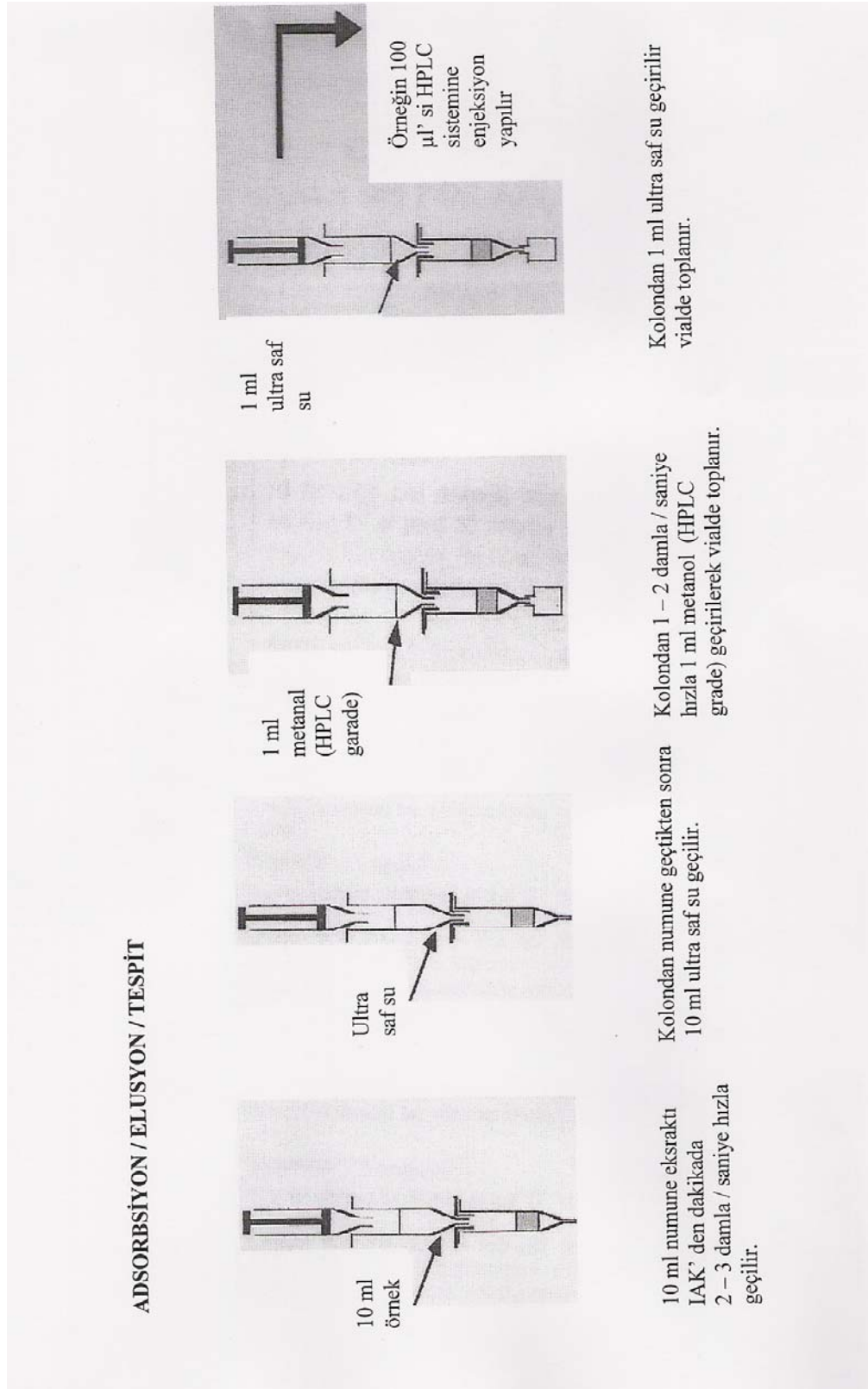
Cam mikrofiberden geçirilen filtrattan enjektörle 10 ml alınmış Immuno affinity kolondan 1-2 damla / saniye hızla geçirilmiştir. Ekstrattan sonra kolondan 2-3 ml hava geçirilmiştir.

Numune ekstraktı kolondan tamamen geçirildikten sonra kolondan 10 ml ultra saf su 1-2 damla / saniye hızla geçirilmiş ve ardından tekrar 2-3 ml hava geçirilmiştir.

Son olarak kolondan 1-2 damla / saniye hızla 1 ml metanol (HPLC Grade) geçirilmiş ve eluat temiz bir vialle alınmıştır. Yine 2-3 ml hava geçirilerek kolonda metanol kalmaması sağlanmıştır.

Kolondan 1 ml ultra saf su geçirilip, vialle alınmış ve bir tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır (2 ml = 1 gr numuneyi temsil eder).

Süzüntünün 1 ml'si küçük vialle alınıp, analizi yapılmak üzere otosampler'a yerleştirilmiş ve 100µl enjeksiyon yaptırılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İmmuno affinite kolon uygulaması (Anonymous, 1999)

3.2.2.6.Türevlendirme

Toplam aflatoksin analizinde B ve G grubu toksinleri ve bunların verdikleri piklerin ayrımını yapmak için türevlendirme yapılır.

3.2.2.7. HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)

Analizlerdeki HPLC koşulları;

Mobil faz = Su : Metanol : Asetonitril (60 : 30 : 20)

Degaze edilmiş mobil faz türevlendirmesi için mobil fazın 1 lt'sine 120 mg KBr ve 350µl (% 65'lik) HNO₃ ilave edilmiştir.

HPLC kolonu = C-18

Akış hızı = 1 ml / dakika

Dedektör = Floresans (Ex : 360, Em :430)

Çarpım faktörü (multiplier) = 2

3.2.2.8. Laboratuvar şartlarında küf oluşturulması

işletmelerden alınan alabalık yemlerinden aflatoksin tespit edilemeyen gruptan 3 adedi laboratuvarda petrilere konularak, yüksek nem ve uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan küfler mikroskopik incelemeler yapılarak tespit edilmiştir.

3.2.2.9.Hesaplamalar ve sonuç

Elde edilen değer 2 ile çarpılarak ppb cinsinden ifade edilir. Aflatoksin fraksiyonlarının hepsi (B₁, B₂, G₁, G₂) için bu hesaplama yapılır. Toplam aflatoksinde bu fraksiyonların toplamına eşittir.

Elde edilen bulguların ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırma da materyal olarak kullanılan alabalık yemlerinde yapılan Aflatoksin B₁ ve toplam Aflatoksin analizleri sonucunda tespit edilen değerler aşağıda bildirilmiştir.

Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi araştırma süresince 33 adet yem numunesi alınmış ve AİKLM mikotoksin laboratuvarında aflatoksin analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 33 adet numunenin, 25 adedinde aflatoksin TLA (tespit limitinin altında) bulunmuştur. Bu da toplam örneğin % 75,75'inin aflatoksin içermediği ya da kullanılan yöntemin tespit limitinin üzerinde aflatoksin içermediğini göstermektedir. Yem numunelerinin 8 adedinde ise (% 24,25) 0,21 ppb'den 0,90 ppb'ye kadar değişen düzeylerde aflatoksin bulunmuştur.

Aflatoksinler arasında en fazla toksik olan grup olması nedeniyle aflatoksin B₁ düzeylerini de inceleyecek olursak Çizelge 4.1'den de görüleceği gibi 33 adet yem numunesinin yine toplam aflatoksinlerde olduğu gibi 33 adet yem numunesinin, 25 adedinde aflatoksin B₁ TLA (tespit limitinin altında) bulunmuştur. Yem numunelerinin 8 adedinde ise (% 24,25) 0,21 ppb'den 0,90 ppb'ye kadar değişen düzeylerde aflatoksin B₁ bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Yem örneklerinin aflatoksin B₁,B₂,G₁,G₂ ve toplam aflatoksin içeriği(ppb)

Numune no	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin B ₂	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin G ₂	Toplam Aflatoxin
1	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
2	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
3	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
4	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
5	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
6	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
7	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
8	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
9	0.21	TLA	TLA	TLA	0.21
10	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
11	0.30	TLA	TLA	TLA	0.30
12	0.63	TLA	TLA	TLA	0.63
13	0.32	TLA	TLA	TLA	0.32
14	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
15	0.21	TLA	TLA	TLA	0.21
16	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
17	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
18	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
19	0.90	TLA	TLA	TLA	0.90
20	0.70	TLA	TLA	TLA	0.70
21	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
22	0.80	TLA	TLA	TLA	0.80
23	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
24	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
25	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
26	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
27	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
28	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA

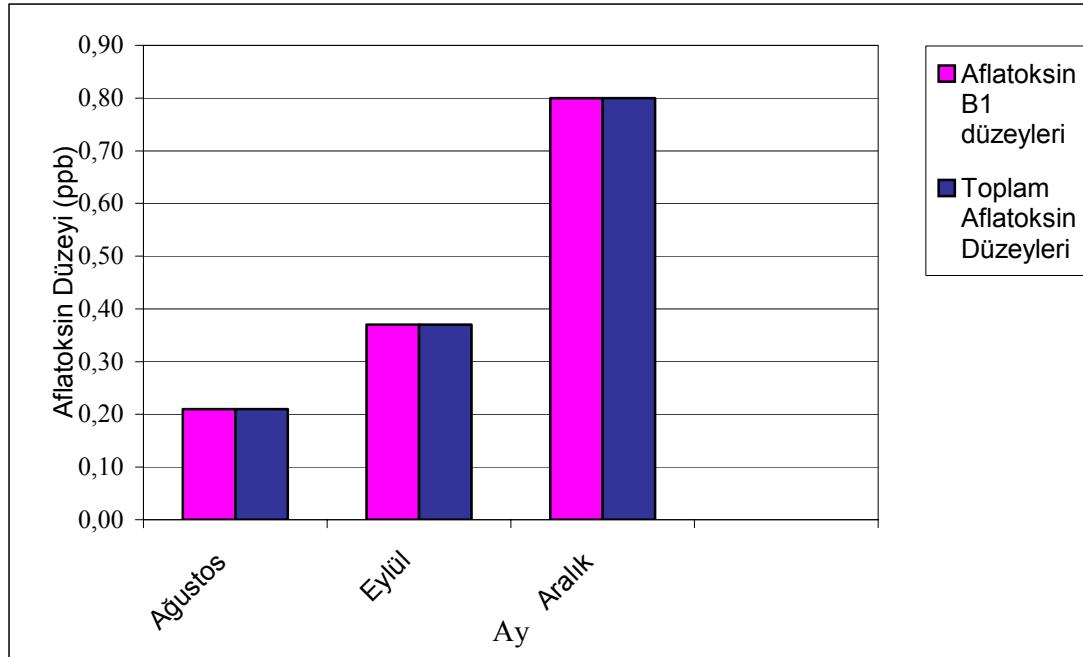
Çizelge 4.1'nin devamı

27	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
28	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
29	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
30	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
31	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
32	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
33	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA
Ortalama	0.1233	-	-	-	0.1233
St. Sapma	0.2571	-	-	-	0.2571

Aflatoksin tespit edilemeyen yemlerin laboratuvar koşullarında inkübe edilmesi sonucunda oluşan küflerin mikroskopik incelemesi yapılmıştır. Bu incelemede *Penicillium* türü küfler tespit edilmiştir.

Kaymak (2000), ülkemiz genelindeki yem fabrikalarından aldığı 59 adet yem örneğindeki aflatoksin analizlerini HPLC yöntemi ile çalışmıştır. Yaptığı analiz sonuçlarından elde ettiği bulgulara göre yem örneklerinin %47,45'inin aflatoksin içermediği, %52,50'sinin de değişik düzeylerde aflatoksin içerdiğini saptamıştır. Bulduğu değerler ülkemiz aflatoksin limitlerini aşmamaktadır. Yine aynı araştırmacı yemlerin dönemlere göre aflatoksin miktarını araştırmış ve en yüksek değerlerin Kasım ayında olduğunu saptamıştır. Aynı zamanda yem üretiminde kullanılan teknolojilerin (Ekstrüzyon, Peletleme) yemlerin aflatoksin içeriği üzerine azaltıcı ya da artırıcı bir etkisi olmadığını fakat bu konuda tam bir sonuca varabilmek için daha fazla örnek üzerinde yeni çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varmıştır.

Adana ve ilçelerindeki alabalık üretim tesislerinden topladığımız 33 adet yem örneğinin %75,75'inin aflatoksin içermediği, %24,25'inin tespit limitinin altında aflatoksin içerdiği ve aflatoksin miktarının Eylül ile Aralık aylarında artış gösterdiği saptanmıştır(Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Aflatoxin B₁ ve Toplam AFL miktarlarının dönemlere göre değişimi

Her iki çalışma HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yem örneklerinin büyük çoğunluğunda Aflatoxin B₁ ve toplam aflatoxin miktarlarının (B₁, B₂, G₁, G₂) tespit limitinin altında olması ülkemizde üretilen balık yemleri açısından sevindirici bir bulgudur. Her iki çalışmada da aflatoxin miktarlarının sonbahar aylarında artış gösterdiği belirlenmiştir.

Altuğ ve Beklevik (2003), farklı kaynaklardan sağladıkları balık yemlerinde aflatoxin analizlerini İAK (İnce Tabaka Kromatografisi) ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) yöntemini kullanarak yapmışlardır. Yöntem oldukça uzun ve karmaşıktır. Analizi yapan kişi oldukça fazla kimyasal maddelere maruz kalmaktadır. Yem türlerine göre aflatoxin kalıntısı dağılımında istatistiki olarak önemli bir fark görmemişlerdir. Ancak balık üretim tesislerinden sağlanan yemlerde aflatoxin düzeylerini, fabrika ve yurtdışı kaynaklı yemlere göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Aflatoxin analizlerinde kullanılan yöntemler İAK ve ELISA yöntemleri HPLC ile kıyaslandığında, İAK ve ELISA yöntemleri genellikle uzun, masraflı, karmaşık ve uzman personel gerektirmektedir. Fakat HPLC (yüksek performanslı

sıvı kromatografisi) oldukça hassas çalışması ve tespit limitinin de çok düşük olması nedeniyle son yıllarda çok fazla tercih edilmektedir. Tek olumsuz yönü oldukça pahalı bir cihaz olmasıdır.

Yaptığımız araştırmada, işletmelerde aflatoksin tayini için alınan yem örneklerinin orijinal ambalajlarında ve serin yerlerde muhafaza edildikleri; üç aydan fazla bekletilmedikleri saptanmıştır. İşletme sahipleri ile yapılan görüşmeler sonucunda alabalıklarda aflatoksinden kaynaklanan hastalıklarla karşılaşılmadığı anlaşılmıştır.

Aflatoksinlerin hayvanlar üzerinde değişik türlerde kanser yapıcı etkisinin olduğu araştırmacılar tarafından saptanmış olsa da Uluslararası Kanser Araştırma Dairesi (IARC) tarafından yalnızca AFB1'in kanserojen etkiye sahip olduğu kanıtlarla açıklanmıştır. İnsan sağlığı açısından önemli bir sorun olan aflatoksinlerden kaynaklanabilecek olası sağlık tehlikelerinin kontrolü için birçok ülkede, gıdalarda ve yemlerde bulunabilecek maksimum limitleri belirleyen sınır değerler bulunmaktadır. İlk olarak WHO ve FAO gibi uluslar arası kuruluşlar gıdalarda tolere edilebilecek aflatoksin miktarını 30µg/kg olarak belirlemişler ve belirlenen miktardan daha fazla aflatoksin içeren gıdaların ithal edilmemesi kararını almışlardır. Bu sınır değerler zaman içerisinde düşürülmüştür (Anonymous, 2003).

Avrupa Birliği'ne üye ülkelerin saptamış oldukları aflatoksin sınır değerleri arasında bile oldukça büyük farklılıklar bulunmaktadır. Bu ülkelerin bir kısmı sınır değerlerini tüm gıdalar için verirken, bir kısmı da gıdaları gruplandırarak sınır değerlerini belirlemişlerdir. Sınır değerleri en düşük ülkelerin başında Almanya, Avusturya, İsviçre ve İngiltere gelmektedir (Anonymous, 2003). Sınır değerler tartışılabilir ve gerektiğinde değiştirilebilir değerlerdir. Önemli olan uluslar arası gıda ve yem ticaretinde ortak normlara yaklaşılması, ticarete rekabet koşullarının bozulmasının önlenmesi ve tüketicilerin korunmasıdır. A.B.D.'de ise, aflatoksinlerle ilgili limit değerler Avrupa Birliği'ne göre 5 kat daha yüksektir ancak bu değerlerin azaltılması ile ilgili çalışmaların başladığı bildirilmiştir (Anonymous, 2003). Türkiye'de yemler için kabul edilen yasal sınır değerler gıdalarla kıyaslandığında Avrupa normlarına daha fazla uymaktadır. Çizelge 4.2'de Türkiye'de aflatoksinlerle

ilgili sınır değerler Avrupa Birliği'ndekine benzer olup Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde belirtilmiştir. Ülkemizde'de 1990-1991 yıllarında gıda ve yem maddelerinde bulunabilecek aflatoksin miktarıyla ilgili sınır değerler yasal olarak belirlenmiş olup en toksik olan aflatoksin B₁'in gıda ve yemlerdeki sınır değerleri ayrı bir öneme sahiptir. Yem maddeleri ve yemlerde yalnızca AFB₁ dikkate alınmıştır. Yavru hayvanların karma yemlerinde genelde ergin hayvanların yemlerinde öngörülen sınır değerlerin yarısına izin verilmiştir.

Türkiye'de son olarak AB direktiflerine dayanılarak 5.02.2005 tarihli ve 25718 sayılı resmi gazetede Tarım ve Köy işleri Bakanlığı tarafından Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkındaki Tebliğ yayınlanmıştır (Anonymous, 2005).

Çizelge 4.2. Bazı Ürünler İçin Ülkemiz Aflatoksin Limitleri (ppb) (Anonymous, 2004b).

Gıda ve Yem Türü	AFL B ₁	Toplam AFL (B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂)	AFL M ₁
Tüm gıda maddeleri	5,0	10,0	-
Baharatlar	5,0	10,0	-
Hububat ve hububat unları	2,0	4,0	-
Peynir	-	-	0,25
Süt	-	-	0,05
Süttozu	-	-	0,5
Bebek mamaları ve devam formülleri (Süt bazlı)	-	-	0,05
Bebek gıdaları ve hazır karışımları	1,0	2,0	-
Yem hammaddeleri	50	-	-
Geviş getiren hayvanların karma yemleri (kuzu buzağı yemleri hariç)	50	-	-
Kümes kanatlıları karma yemleri (gençlerin yemleri hariç)	20	-	-
Diğer karma yemler	10	-	-

Ülkemizde balık yemlerinde aflatoksin düzeyi konusunda henüz yeteri kadar araştırma yapılmadığı bilinmektedir. Ancak yapılan araştırmalar analiz edilen yemlerin hiçbirinin ülkemiz aflatoksin limitlerini aşmadığını göstermektedir. Bunda alabalık yemi üreten fabrikalarımızın hammaddelerinin büyük bir kısmını yurtdışından almaları ve yurtdışından ithal edilen bu hammaddelerin yurdumuza girişinde mutlaka analizlerinin yapılmasının ve analiz sonucunda limitleri aşanların ülkeye sokulmamasının yanında, tüm balık yemi rasyonlarının vazgeçilemez hammaddesi olan balık unlarının da büyük oranda ithal olması ve üretim teknolojisinin toksin oluşumuna izin vermemesi nedeniyle aflatoksin yönünden oldukça az risk taşıdıkları düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. Yem örneklerinin dönemlere göre aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin içerikleri (ppb).

Numune No	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
1	TLA	0.21	TLA	TLA	TLA	TLA
2	TLA	TLA	0.30	TLA	TLA	TLA
3	TLA	TLA	0.63	TLA	TLA	TLA
4	TLA	TLA	0.32	TLA	TLA	TLA
5	TLA	TLA	0.21	TLA	TLA	TLA
6	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA	0.90
7	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA	0.70
8	TLA	TLA	TLA	TLA	TLA	0.80
Ortalama	0.02625	0.1825	-	-	-	0.3000
St. sapma	0.0794	0.2341	-	-	-	0.3946

Çizelge 4.3’den de görüleceği gibi yem numunelerinde bulunan aflatoksin B₁ düzeylerinde ve toplam aflatoksin düzeylerinde Eylül ve Aralık dönemlerinde gözle görülür bir artış olmuştur. Bunun üzerine yem numunelerindeki aflatoksin

düzeylerinin dönemsel olarak artış gösterip göstermediğini ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olup olmadığını tespit etmek amacı ile Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi her dönemde alınan numuneler ve sonuçları sıralanmıştır.

Bu sonuca göre bölgemizde üretilen alabalık yemlerindeki aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin düzeylerinin Eylül ve Aralık dönemlerinde döneminde arttığı tespit edilmiştir.

Nigethe ve ark. (1992b), gökkuşağı alabalığı ile tilapya arasında, oral olarak alınan ³H-AFL B₁’in, hepati konsantrasyonlarında tür farkını araştırdıkları çalışmalar sonucu elde ettikleri bulgular, uygun dozdaki aflatoksin B₁ tüketiminde, tilapya karaciğerinin gökkuşağı alabalığı karaciğerine göre, çok daha düşük düzeyde, aflatoksin B₁ veya metabolitlerine maruz kaldığını göstermektedir. Bu nedenle, aflatoksin B₁’in hepatotoksik etkisi, tilapyalarda gökkuşağı alabalıklarında olduğu ölçüde değildir. Ancak bu sonuçlara bakarak, aflatoksin B₁’in tilapyalar için toksik olmadığını söylemek mümkün değildir. Tam aksine yine bu çalışma, yüksek dozda aflatoksin B₁’in tilapyalarda, büyümede bozukluk, büyümede gerileme, yem alımında azalma ve karaciğer kanserine yol açtığını göstermiştir. Tilapyaaların yetiştirildikleri bölgeler itibarı ile alabalıklara oranla çok daha yüksek düzeylerde aflatoksine maruz kalma ihtimalinin olduğu göz önüne alınacak olursa aflatoksinlerin, tilapyalar için de önemli bir sorun olduğunu saptamışlardır.

Tunail (2000), aflatoksinler içinde en yüksek toksisite AFB₁ ve AFB₃ (parasitikol)’e, en düşük toksisitenin ise AFG₂ ve AFM₂’ye ait olduğunu u bildirmiştir. Ayrıca tarımsal ürünlerde ve yemlerde en sıklıkla görülen aflatoksinlerin toksisite sıralaması ; AFB₁>AFM₁ =AFG₁>AFB₂>AFG₂>AFM₂ şeklinde olduğunu belirlemiştir. Bu araştırmada da AFB₁ değerleri çalışılmıştır. Böylelikle balıklar için en yüksek toksisite riski oluşturan aflatoksin araştırılmıştır.

Şahin ve Korukluoğlu (2000), yaptıkları araştırmalar sonucunda aflatoksinlerin kanserojen etkileri yanında mutajen, teratojen ve koruma sistemlerini zayıflatıcı etkileri olduğunu, ağız yolu ile belirli miktarın üzerinde alınmaları veya enjeksiyonla vücuda verilmeleri durumunda hemen kendini gösteren zehirlenme belirtilerine karşın; çok küçük miktarlarda alınmaları sonucu belirtiler ortaya

çıkmadığını veya çıkmayabileceğini saptamışlardır. Ancak uzun süren alımlar sonucunda vücutta birikerek depolandıkları organ ve dokulardaki miktarları belirli düzeyi aştığında etkilerini gösterdiklerini, bir süre sonrada kanser gibi tedavisi çok zor ya da olanaksız hastalıklara neden olduklarını belirtmişlerdir. Bu nedenle düşük değerlerde önemsenmelidir.

Tunail (2000), kronik toksisitenin uzun sürede çok daha düşük dozlarda AFB₁' in yemlerle tüketilmesi sonucunda karaciğer kanseri ve deformasyonları şeklinde ortaya çıkabildiğini ve gökkuşağı alabalığında karaciğer kanserine neden olan günlük doz 0.5-2.0 µg. kg⁻¹ olduğunu belirlemiştir.

Özkaya (2000), balık türleri içinde aflatoksinlere karşı en duyarlı türlerin alabalıklar olduğunu ve özellikle alabalık yavrularının aflatoksinlere karşı çok fazla hassasiyet gösterdiklerini belirlemiştir. Çizelge 4.4'de gökkuşağı alabalığının aflatoksine duyarlılığı gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. Gökkuşağı alabalığında aflatoksikozla ilgili spesifik septomlar (Anonymous, 2004)

Tür	Yaş	Besinde test edilen aflatoksin düzeyi (ppb)	Beslenme süresi	Hastalık durumu
Rainbow trout	Fingerlings	0.4	12 ay	Alabalığın karaciğerinde %40 tümör oluşumu

Royes ve Yanong (2004), yaptıkları çalışmalar sonucunda aflatoksinlerin besinlerdeki önemli elemanları etkileyerek hastalığa dolaylı yollarla neden olabildiğini, örneğin A vitamini gibi yağda çözünebilen antioksidantlar ve C vitamini (bağışıklık fonksiyonu için önemli) ve Thiamin (metabolizma ve sinir fonksiyonu için önemli) gibi vitaminlerin ve suda çözünebilen antioksidantların bu toksinler tarafından yemde parçalanabildiğini bildirmişlerdir.

Alabalık yemlerinin çoğunda aflatoksin değerinin tespit limitinin altında olması, yem hijyeni, kalitesi ve alabalıkların sağlığı açısından sevindirici bir bulgudur. Diğer yandan az miktarda ve düşük değerlerde bulunması hiçbir soruna yol açmayacağı anlamına gelmez. Bunun için işletmelerdeki balık yemlerinin düzenli

olarak kontrolünün yapılması, depolanma şartlarının takip edilmesi ve benzer çalışmaların genişletilerek, kontrollü olarak yapılması olası kayıpların önlenebilmesi açısından yararlı olacaktır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Elde edilen bulgular ve literatür değerlendirmesine göre bazı sonuç ve öneriler aşağıda sıralanmıştır:

- Ülkemizde balık yem sanayisi son yıllarda gelişerek önem kazanmıştır. Yemlerde aflatoksin sorunu ekonomik kayıplara ve dolaylı yollarla da insan sağlığına olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu sorunları giderebilmek için balık yemlerinin, balık üretim işletmelerinde düzenli olarak kontrolünün yapılması, yemlerin depolanma koşullarının incelenmesi olası kayıpların önlenmesi açısından yararlı olacaktır.
- Ne yazık ki çoğu balık üreticileri aflatoksinin tehlikeli etkilerinin farkında değildirler. Aflatoksikozisten dolayı balık ölümleri fazla değildir ancak düşük et verimi, zayıf performans, hastalık şüphesi ve üreme zorlukları gibi ekonomik kayıplara neden olan durumlar daha çok önemsenmektedir.
- Alabalık üretim tesislerinde depolanan yemlerin küflendiği tespit edildiğinde, küflü yemlerin balıklara yedirilmemesi ve bunların mutlaka atılması gerekmektedir. Çünkü bu yemler yapılarında bazı toksinleri içerebilmekte ve balıklarda toplu ölümlere yol açabilmektedir.
- İşletmelerin satın aldıkları yemlerin düzenli olarak kaydını tutmaları ve gerekli analizleri yaptırmaları hem hastalıkların teşhisi ve hem de yemin kalitesi açısından önemli ipuçları vermektedir.
- Yeni hazırlanmış ve düzgün bir şekilde depolanmış yemler tercih edilmelidir. Döküntüler yem tanelerinden ayrılmalı ve taneler temiz kovalarda veya binalarda depolanmalıdır. Mümkün olduğu durumlarda yemler sıcaklık ve nem kontrolü yapılan odalarda saklanmalıdır. Sıcaklık ve nem kontrolünün sağlanamadığı durumlarda, yemler, yerden yüksekte, paletlerde, ılık ve kuru bir alanda en fazla üç ay saklanabilir. Eğer yemler kovada dışarıda tutuluyorsa iki haftadan fazla saklanması önerilmemektedir.
- Alabalık yemi üreten balık işletmelerimizin ise bu konuda yapabilecekleri ve dikkat etmeleri gereken en önemli husus, satın aldıkları yemlerde aflatoksin

bulunmamasını bir belge (garanti belgesi, analiz raporu) ile satıcıdan istemelidirler.

- Alabalık üretimi yapan çiftliklerin, üreticilerle işbirliği yaparak, burada depolanan yemlerin belirli aralıklarla kontrolünü yaptırması, yemlerin hangi ortamlarda ve ne şekilde depolanması gerektiğini ayrıca küflü yemlerin kullanılması durumunda karşılaşılabilecekleri sorunlar hakkında bilgilendirilmesi de sorunların çözümünde yararlı olacaktır.
- Alabalık üreticilerine, ilgili kurumlarca eğitim seminerlerinin verilmesinin de üreticileri bilinçlendireceği unutulmamalıdır.
- Konuyla ilgili referans laboratuvarları hızla oluşturulmalı ve gerekli incelemeler buralarda yapılmalıdır.

- ALTUĞ, G., BEKLEVİK, G., 2003. Balık Üretim İşletmeleri, Yem Fabrikaları ve Yurtdışı Kaynaklı Bazı Balık Yemlerinde Aflatoksin Düzeyleri. Türk J. Anim. Sci. 27: 1247 – 1252. TUBİTAK.
- ANONYMOUS, 1999. Easi-Extract™ Aflatoxin Simplified Procedure. Rhone-Diagnostic Technologies Ltd.
- ANONYMOUS, 2003. Aflon Teknoloji Araştırma Geliştirme ve Ticaret A. Ş.
<http://www.aflon.net/aflatoksin.html>
- ANONYMOUS, 2004a. Adana Tarım İl Müdürlüğü, Proje ve İstatistik Şubesi.
- ANONYMOUS, 2004b. T.C.Tarım ve Köy İşl. Bak. Koruma ve Kontrol Genel Müd. Yem Kanunu. Yem Yönetmeliği ve Tebliğler, 1998. Ankara.
- ANONYMOUS, 2005. Resmi Gazete. Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ. Sayı: 25718. sayfa:17-24. Şubat-2005.
- ARANA, S., TABATA, Y. A., SABINO, M., RIGOLINO, G.M., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J., 2002. Differential effect of chronic aflatoxin B₁ intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Med.Vet. , Vol: 34, No: 2, Valdivia.
- BAILEY, G.S., WILLIAMS, D.E., WILCOX, J.S., LOVELAND, P.M., COULOMBE, R.A., HENDRICKS, J.D., 1988. Aflatoxin B₁ carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. Nov., 1988. 9(11): 1919-1926.
- CENGİZLER, İ. , 2000. Balık Hastalıkları. Ç.Ü. Su Ürünleri Fak. Yayın No: 7. 136s. Adana.
- CURTIS, L.R., ZHANG, Q., EL-ZAHR, C., CARPENTER, H.M., MIRANDA, C.L., BUHLER, D.R., SELIVONCHICK, D.P., ARBOGAST, D.N. AND HENDRICKS, J.D. 1995. Temperature-modulated incidence of aflatoxin B₁-initiated liver cancer in rainbow trout. Fundamental Application Toxicology, 25 (1) ; 146-153.

- DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILL, T.J., 1997. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 768p.
- GALVANO,F. ; GALOFARO, V. ; GALVANO, G., 1996. Occurance and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: A Worldwied Review. Journal of food Protection. 59(10), p. 1079-1090.
- HALVER J.E., 1968 Aflatoxicosis and trout hepatoma. In aflatoxin, Sciencificbackground, Control and Implications. F.A. Goldblat, Ed. Academic press. Jul-Aug;69 (7):1249-78.
- HENDRICKS ve BARLEY, 1989. Aquaculture fish diseases shrimpwhite spot disease solutions. <http://www.ublcorp.com/aqua.html>
- HEPERKAN, D., 2003. Gıdalarda Mikotoksinler ve Ülkemiz Açısından Önemi. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. 18-19 Eylül 2003, İstanbul.
- HUSSEIN, M.; GABAL, MA.;WILSON, T.; SUMMERFELT, RC. 1993. Vet Hum Toxicol. Oct; 35(5): 396-8. Department of Microbiology, Immunology and Medicine, Iowa State University, Ames 50011.
- KOP, A, F.; KORKUT, Y, A., 2002. Balık Yemlerinde Kalite Kontrol. E. Ü. Su Ürünleri Dergisi. Cilt: 19, Sayı: (1-2): 271-276. İzmir.
- KORKUT, Y, A.; HOŞSU, B.; GÜLTEPE, N., 2002. Balıklarda Beslenmeye Bağlı Hastalıklar. E. Ü. Su Ürünleri Dergisi. Cilt: 19, Sayı: (3-4): 555-564. İzmir.
- KAYMAK, T., 2000. Türkiye’de Üretilen Alabalık Yemlerindeki Aflatoksin Düzeylerinin Tespiti. Yüksek Lisans Tezi. Su Ürünleri Fakültesi. Ankara Üniversitesi.
- LEE, S.E.; CAMPBELL, B.C.; MOLYNEUX, R.J.; HASEGAWA, S.; LEE, H.S., 2001. Inhibitory Effects of Naturally Occuring Compounds on Aflatoxin B₁ Biotransformation. J. Agric. Food Chem. 49: 5171-5177.
- LOVELL, 1992. Aquaculture fish diseases shrimpwhite spot disease solutions. <http://www.ublcorp.com/aqua.html>
- MURJANI, G., 2004. Chronic aflatoxicosis in fish and its relevance to human healt. www.shaping-the-future.de/pdf_www/095-paper.pdf

- NAKATSURU, Y., QIN, X., MASAHITO, P. AND ISHIKAWA, T. 1990a.
(Alınmıştır., KAYMAK, T., 2000. Türkiye’de Üretilen Alabalık Yemlerindeki Aflatoksin Düzeylerinin Tespiti. Yüksek Lisans Tezi. Su Ürünleri Fakültesi. Ankara Üniversitesi).
- NAKATSURU, Y., QIN, X., MASAHITO, P. AND ISHIKAWA, T. 1990b.
(Alınmıştır., KAYMAK, T., 2000. Türkiye’de Üretilen Alabalık Yemlerindeki Aflatoksin Düzeylerinin Tespiti. Yüksek Lisans Tezi. Su Ürünleri Fakültesi. Ankara Üniversitesi).
- NAKATSURU, Y., QIN, X., MASAHITO, P. AND ISHIKAWA, T. 1990c.
Immunological detection of in vivo aflatoxin B sub(1) – DNA adduct formation in rats, rainbow trout and coho salmon. Carcinogenesis, 11 (9) ; 1523-1526.
- NGETHE, S., HORSBERG, T.E. , INGEBRIGTSEN, K. 1992a. Extrahepatic disposition of ³H-aflatoxin B1 in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pharmacol Toxicol. 1992 Oct;71(4): 262-71
- NGETHE, S., HORSBERG, T.E., MITEMA, E. AND INGEBRIGTSEN, K. 1992b.
Species differences in hepatic concentration of orally administered super (3) H-AFB sub(1) between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 114 (3-4) ; 355-358.
- ORNER, G.A., HENDRICKS, J.D., ARBOGAST, D. AND WILLIAMS, D.E. 1998.
Modulation aflatoxin-B sub (1) hepatocarcinogenesis in trout by dehydroepiandrosterone: Initiation / post – initiation and latency effects. Carcinogenesis, 19 (1) ; 161-197.
- ÖZKAYA, Ş., 2000. Mikotoksinler “Gıda ve Yemlerde Aflatoksin Analizleri”. Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Eğitim Programı. 4-15 Eylül 2000. Ankara.
- ROYES, J.A.B., YANONG, R.P.E., 2004a. Molds in fish feeds and aflatoxicosis. <http://edis.ufl.edu/index-html> www.edis.ifas.ufl.edu / FAO-1k

- ROYES, J.A.B., YANONG, R.P.E., 2004b. Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, University of Florida. <http://edis.ufl.edu>.
- ROYES, J.A.B., YANONG, R.P.E., 2004c. Tropical Aquaculture Laboratory-Ruskin, FL 33570-3434, Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, University of Florida. <http://edis.ufl.edu>.
- SINHUBER, R.O., WALES, J.H., AYERS, J.L., ENGEBRECHT, R.H., AND AMEND, D.L., 1968a. Dietary factors and hepatoma in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Aflatoxins in vegetable protein feedstuffs J. Natl. Cancer Inst. 1968. Sep. 41(3):711-8.
- SINHUBER R.O., WALES, J.H., AYERS, J.L., LEE, D.J., 1968b. Dietary factors and hepatoma in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) II. Carcinogenesis by cyclopropenoid fatty acids and effect of gossypol and altered lipids on aflatoxin-induced liver cancer. J. Natl. Cancer Inst. 1968. Dec. 41(6):1293-301.
- ŞAHİN, İ. ve KORUKLUOĞLU, M. 2000. Küf-Gıda-İnsan. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No:155, 122s. Bursa.
- ŞANLI, Y. , 1989. Besinlerde küflenme olgusu, mikotoksinler ve mikotoksikozisler. Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi., 3 (3-4): 127-147.
- ŞANLI, Y. , 2000. Yem Küflenmeleri, Mikotoksinler ve Kontrol Yöntemleri. Çiftlik Dergisi, Haziran Sh: 83-98 .
- TUNAİL, N., 2000. Mikrobiyal Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı. Bölüm 3. Sim Matbacılık Ltd. Şti. Ankara.
- VICAM, 1999. Aflatest® , Instruction Manuel. Watertown, USA. pp: 73-74.
- VIDYASAGAR, T.; VYJAYANTHI, V.; SUJATHA, N.; RAOS, S., 1977. Quantification of Aflatoxin B₁-N⁷-Guanine Adduct In Urine by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Coupled with Immunoaffinity Chromatography. Journal of AOAC International Dairy Journal 9(497-505).

WANG, J.S.; GROOPMAN, J.D., 1999. DNA Damage by Mycotoxins. Mutation Research 424: 167-181.