

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ELAZIĞ BÖLGESİ KANATLI YEMLERİNDE BULUNAN
MANTAR TÜRLERİ İLE BAZI MİKOTOKSİNLERİN
DÜZEYLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

DOKTORA TEZİ

Nurhan ŞAHİN (DOĞUKAN)

F.Ü.VETERİNER FAKÜLTESİ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME
HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr.Mustafa SARI

ELAZIĞ-1994

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	IV
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mikotoksinlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	2
1.1.1.Aflatoksinler.....	2
1.1.2. Okratoksinler.....	3
1.2. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	4
1.2.1. Fiziksel Faktörler.....	4
1.2.1.1. Temperatur.....	4
1.2.1.2. Nem.....	5
1.2.1.3. Atmosfer Bileşimi.....	7
1.2.1.4. Mekanik Zedelenmeler.....	7
1.2.2. Kimyasal Faktörler.....	8
1.2.2.1. pH Değeri.....	8
1.2.2.2. Yemlerde Besin Maddeleri.....	8
1.3. Yemlerde Toksinlerin Oluşumu.....	8
1.4. Mikotoksikozislerin Klinik Belirtileri.....	10
1.4.1.Aflatoksikozisin Klinik Belirtileri.....	11
1.4.1.1. Akut Aflatoksikozis.....	11
1.4.1.2. Kronik Aflatoksikozis.....	12
1.4.2. Okratoksinlerin Klinik Belirtileri.....	14
1.5. Mikotoksikozislerin Teşhisi.....	15
1.6. Mikotoksin İçeren Yemlerle Zehirlenme.....	17
1.7. Aflatoksin ve Okratoksinlerin doku ve Organlardaki Birikintileri.....	18
1.8. Yasal Düzenlemeler.....	19
2. MATERYAL VE METOT.....	22
2.1. Materyal.....	22
2.2. Metot	24

2.2.1. Yem Örneklerinin Hazırlanması.....	24
2.2.2. Mikolojik Çalışmalar.....	24
2.2.2.1. Stok Süspansiyonunun Hazırlanması.....	24
2.2.2.2. Stok Yem Süspansiyonunun Sulandırılması.....	25
2.2.2.3. Ekimlerin Yapılması.....	25
2.2.2.4. Hesaplama.....	26
2.2.2.5. Küflerin İdentifikasyonu.....	27
2.2.5.6. Laktofenol Anilin Blue Boyama Tekniği.....	28
2.2.3. Toksin Analizleri.....	29
2.2.3.1. Aflatoksin Standardının Hazırlanması.....	29
2.2.3.2. Okratoksin A Standardının Hazırlanması.....	30
2.2.3.3. Aflatoksinler ve Okratoksin A İçin Ekstraksiyon ve Temizleme.....	31
2.2.3.4. Aflatoksin ve Okratoksin A İçin Silika Jel Kolon Kromatografisi.....	31
2.2.3.5. İnce Tabaka Kromatografisi İle Kalitatif Aflatoksin ve Okratoksin A Tayini.....	32
2.2.3.6. Doğrulama Testleri.....	35
2.2.3.7. Aflatoksin ve Okratoksin A Miktarlarının Tayini.....	37
2.2.3.8. Yöntemin Geri Alma Düzeyinin Belirlenmesi.....	39
2.2.3.9. İstatistiksel Analizler.....	39
3.BULGULAR.....	40
3.1.Örneklerde Ham Su Düzeyleri.....	40
3.2. Örneklerde Toplam Küf Mantarları Sayısı.....	41
3.3. Küf Mantarları Türleri.....	46
3.4. Aflatoksin ve Okratoksin A Analizlerinin Sonuçları.....	51
3.4.1. Kullanılan Yöntemin Geri Alma Oranları.....	51
3.4.2. Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeyleri.....	52

4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
4.1. Kūf Mantarı Sayıları ve İdentifikasyonu.....	62
4.2. Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeyleri.....	67
5. ÖZET.....	73
6. SUMMARY.....	75
7. KAYNAKLAR	77
8. ÖZGEÇMİŞ.....	88
9. TEŞEKKÜR.....	89



Ö N S Ö Z

Ülkemizde nedeni bilinmeyen hastalıklara bağılı olarak hayvanlarda önemli verim düşüklüklerine, hatta ölümlere rastlanmaktadır. Hijyenik olmayan ortamlarda yemlere geçen mikroorganizmaların ürettikleri toksinler tarafından oluşturulan hastalıklar bunlar içerisinde önemli yer tutmaktadır.

Ilıman ve rutubetli bölgelerde üretilen veya elverişli olmayan koşullarda depolanan yem hammaddeleri veya bunlardan hazırlanan karma yemler, mantarların üremesi ve mikotoksin sentezi için uygun bir beslenme ortamı oluşturduğu için, her zaman küflenme riskiyle karşı karşıya kalmaktadır.

Günümüzde, başta tavukçuluk sektörü olmak üzere, tüm hayvancılık kollarını tehdit eden küflenmiş yem sorunu, kamu oyunun yakın ilgisini çekmektedir. Her yıl dünya tahıl ve yağlı tohum üretiminin önemli bir kısmı mikotoksinlerle kirlendiği için kullanılamamaktadır. Oysa, küf mantarlarının hayvanlarda yol açtığı zehirlenmeler son yirmi yıla kadar yeterince önemsenmemiştir.

Mikotoksinlerle bulaşmış yemleri tüketen evcil hayvanlar yalnız mikotoksin almakla kalmayıp, aynı zamanda bu tür toksinleri et, süt ve yumurta gibi ürünlerine geçirerek, dolaylı yoldan insanlara da yansıtmaktadır. Bu nedenle, insanlar bitkisel ürünler kadar, hayvansal ürünler aracılığıyla da mikotoksinleri alma tehlikesiyle karşılaşmaktadır.

Dünya nüfusunun hızla çoğalması, hayvansal ürünlere olan talebin, buna bağılı olarak da karma yem üretiminin artmasına yol açmaktadır. Bu tür yemler hijyenik olmayan depo, yem fabrikası ve kümes gibi yerlerde küf mantarları ile kontamine olabilmektedir.

Ülkemizde son yıllarda başta kanatlı ve yavru hayvan yemleri olmak üzere, yemlerdeki mikotoksinlere bağlı olarak şikayetlerin artması ile birlikte bu alanda bazı araştırmaların yapıldığı göze çarpmaktadır. Yöremizde ise, bu konuda yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. İşte bu görüşten yola çıkarak, kanatlı yemlerinde küf mantarlarının izolasyon ve identifikasyonu ile Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ve Okratoksin A düzeylerinin belirlenmesine ışık tutmak amacıyla bu araştırma yapılmıştır.



1. GİRİŞ

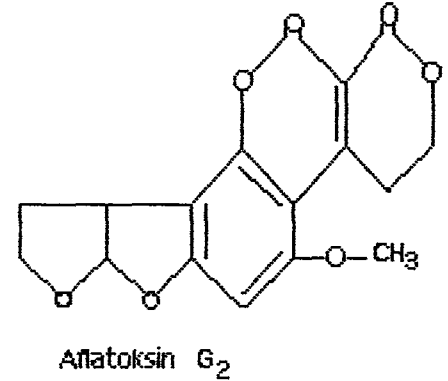
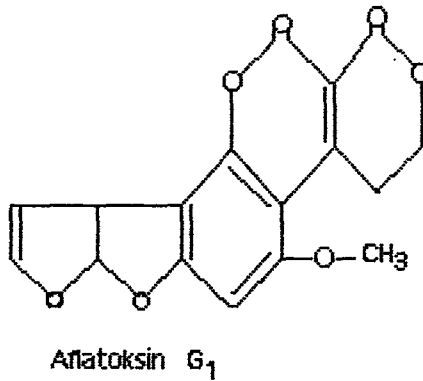
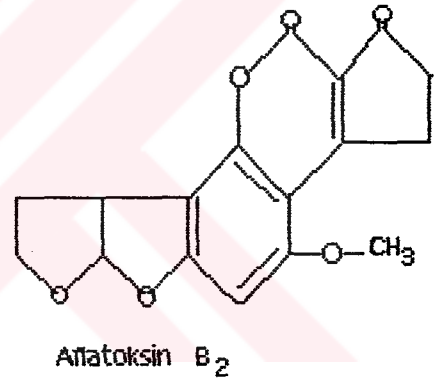
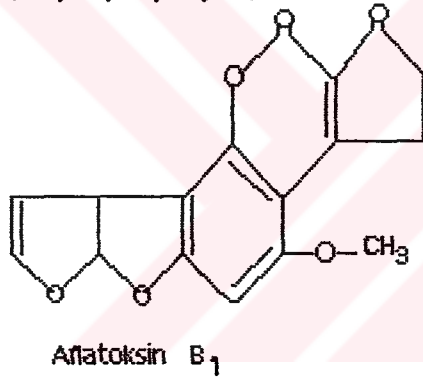
Küf mantarları tarafından uygun şartlar altında salgılanan toksik metabolitlere **mikotoksin** adı verilmektedir. Mikotoksin terimi, Yunanca mantar anlamına gelen **myces** ve Latince zehir anlamına gelen **toxicum** kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Küf mantarlarının toksinleri ile bulaşık yemlerin hayvanlar tarafından alınması ile oluşan zehirlenmelere de **mikotoksikozis** denmektedir (8,21,48,49).

Mikotoksinler, yemlerdeki pek çok besin maddelerini kullanarak yemlerin kalitesini bozmakla kalmaz, aynı zamanda kanatlılarda bazı hastalıklara hatta ölümlere de yolaçabilirler (8,13,23). Yemlerde bulunabilen ve hayvan sağlığı açısından önemli olan mikotoksinler şu şekilde sıralanabilir: Aflatoksin, okratoksin, sitrinin, zearalenon, patulin, sterigmatosistin, penisillik asit, sporidesmin, alternaria, sitreoviridin, rubratoksinler, tenuazonik asit, sikloklorotin, rugulosin, tremorin A, ergot alkaloidleri, kojik asit, oksalik asit ve trikotesenler (6,35,48,92). Bu toksinler içinde aflatoksinler, hemen her tür yemde üreyebilmesi, karsinojenik olması (10,44,50,81,92) ve hayvan ürünlerine geçebilmesi açısından ilk sırayı almaktadır. Nitekim, epidemiyolojik araştırmalar sonucunda, Orta Afrika Ülkelerinde yaşayan insanlarda görülen kanser olaylarının, tüketilen küflenmiş besinlerin miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür. Bu yolla meydana gelen kanser olgularının tüm kanser olguları içinde %40 lık pay aldığı ortaya konmuştur. Aflatoksin karsinojenisinde, doz-tepki ilişkisine bağlı olarak, sürekli biçimde 0.1 ppb düzeyinde aflatoksin B₁ ile kirlenmiş besin alan 100 000 insandan 240 kadarında kanser oluşabileceği, bu düzeyin 0.3 ppb'e yükselmesi durumunda da kanser olan insan sayısının 1100'e çıktığı görülmüştür (82).

1.1.Toksinlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

1.1.1.Aflatoksinler

Aflatoksin, kökenini *Aspergillus*'un *A. flavus*'un, FLA harflerinden almıştır (6,8,22,87). Ultraviyole ışığı altında (UV) 365 nm'de mavi (Blue) floresans veren B₁, B₂, yeşil (Green) floresans veren G₁ ve G₂ gibi fraksiyonları olan aflatoksinler, daha çok *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri tarafından sentezlenirler (21,54). Bunların yanında M₁,M₂, B_{2a}, H, D, G fraksiyonları da identifiye edilmiş, fakat bunların karakterizasyon çalışmaları henüz tamamlanmamıştır (6,25). B₁, B₂ ve G₁, G₂ fraksiyonlarının kimyasal yapıları Şekil 1'de açık olarak gösterilmiştir (21,25,27,43,72).



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

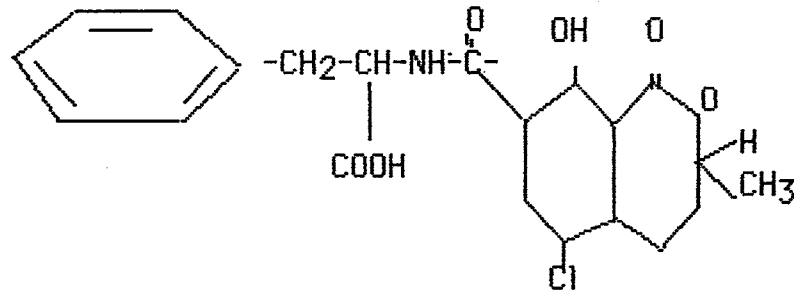
Aflatoksinler ısıya karşı son derece dayanıklıdır. Molekül, ancak erime noktasına erişen bir sıcaklık derecesinden sonra yıkılır. Difurocumarin karakteri gösteren aflatoksinler, kloroform, metanol, etanol, benzol, aseton, tetrahidrofuron gibi solventlerde kolayca erirler (6,29,35,43,92).

Tablo 1: Aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal yapıları (92)

Aflatoksin	Kimyasal formülü	Molekül ağırlığı	Erime noktası, °C	Absorpsiyon katsayısı	Floresan emisyonu, nm
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	21800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	24000	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	17700	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	17100	450

1.1.2. Okratoksinler

Okratoksinler, *Aspergillus*'ların 7, *Penicillium*'ların 6 türünden sentezlenirler (21). Bunların içinde en önemlileri *P.viridicatum* ve *A. ochraceus*'tur. Okratoksinler, amino asit yapısında bileşik olup, fenilalanin zincirlenmiş isokumarin türevleri ile yakın ilişkili bir gruptur (21). Bilinen 9 okratoksin içinde yalnız okratoksin A'nın çevresel toksikant olarak rol oynadığı belirtilmektedir (27,29). Okratoksin A'nın kimyasal yapısı Şekil 2 de gösterilmiştir (19,27).



Şekil 2: Ochratoxin A'nın kimyasal yapısı

Ochratoxin üreten küf mantarları, yağ, çürük bitkiler, böcekler ile depo ve tohumlarda yaygındır (21,29). Toksik A.ochraceus suşları, sorgum, yerkıstığı, küflü pirinç, fasulye ve biberden izole edilmiştir (21). P. viridicatum'un toksijenik suşları ABD, Danimarka ve Kanada gibi ülkelerde yaygın olarak tahıllarda tespit edilmiştir (21).

1.2.Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

1.2.1.Fiziksel Faktörler

Küf mantarlarının gelişmesi, dolayısıyla mikotoksin kontaminasyonunun derecesi ve oluşumu, coğrafik ve mevsimsel etkenler ile yemin vejetasyon dönemi, ürün alma ve depolama koşulları (sıcaklık, nem düzeyi, havalandırma, karanlık ve loş olma) gibi etkenlere bağlı olarak önemli değişiklikler gösterir.

1.2.1.1. Temperatur

Mantarların üremeleri için 20-30°C lik bir temperatur genellikle optimum olarak kabul edilmektedir (6,21,54,80). Ancak, mantar türleri

arasında tercih edilen sıcaklık derecesi açısından bazı farklılıklar da göze çarpmaktadır. Nitekim, *A.flavus* ve *A.parasiticus* 4-50⁰C arasında değişen sıcaklıklarda üreyebilen mezofilik küf mantarlarıdır (21,48,54,92). Bunun yanında, *P. viridicatum* 5-10⁰C de Okratoksin A oluşturabilmektedir (8,48) *Fusarium*, *Cladosporium* ve *Aspergillus glaucus* gibi mantarlar 0⁰C nin altında bile üreyebilmektedir (48). Ancak, bu mantarların aflatoksin sentezleyebilmeleri için optimal sıcaklık 30⁰C olarak kabul edilmektedir. Nitekim, şimdiye kadar 8⁰C nin altında veya 45⁰Cnin üstünde herhangi bir aflatoksin oluşumu gözlenmemiştir (6,29,47,54). Öte yandan, 30⁰C ye kadar olan sıcaklık derecelerinde Aflatoksin G₁, 30⁰C nin üstünde de Aflatoksin B₁ üretimine rastlandığı bildirilmektedir (21,54).

1.2.1.2. Nem

Mikroorganizmaların üremelerinde su aktivitesi, havanın bağıl nemi ve yemdeki su düzeyi büyük önem taşımaktadır (54,64). Su aktivitesi aşağıdaki gibi bir formül ile gösterilmektedir (54).

$$a_w = \frac{p}{p^0}$$

a_w : Su aktivitesi

p : Substratın su buharı basıncı

p^0 : Eşit hava basıncı ve sıcaklıkta suyun buhar basıncı

A.flavus ve *A.parasiticus* sporlarının üremeleri için su aktivitesi değerinin en az 0.84 olduğu bildirilmektedir (54,92). Toksik mantar türlerinin üremeleri için optimal a_w değerleri 0.95-0.98 sınırları içerisinde bulunmaktadır (54).

Havadaki bağıl nemin de mantar üremesi üzerinde önemli rolü vardır. Genellikle, %60 ın üstündeki bağıl nem mantar üremesini artırmaktadır (8,49). Bunun yanında, ham su düzeyi de küf mantarlarının üremesini yakından etkilemektedir. Nitekim, *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi ambar küfleri %13-18 arasındaki su düzeyinde çok çabuk üremektedirler (6,21,48). Ham su oranının %9 un altına düşmesi halinde, mantarlar genellikle toksin salgılayamazlar (6,22). Bu nedenle, hasat edildikten sonra, tahıl tanelerindeki ham su oranının bu kiritik değer altına düşürülmesi pratikte büyük önem taşımaktadır.

Bazı tane yemlerin ve yağlı tohumların depolanma sırasında uygun bir şekilde korunabilmeleri için içermeleri gereken ham su düzeyleri Tablo 2'de gösterilmiştir (24).

Tablo 2: Bazı tane yemlerin ve yağlı tohumların küflenmeden saklanabilmeleri için gerekli ham su oranları ve dayanma süreleri

Tane Yemler ve Yağlı Tohumlar	Ham su düzeyi , %	
	1 yıl	5 yıl
Buğday	13-14	11-12
Arpa, yulaf, mısır	-	11
Darı	<11	-
Soya fasülyesi	10	10
Pamuk tohumu	10-11	-
Yer fıstığı	7	-

Yemdeki ham su oranının %15 i aşması durumunda daha çok *A.candidus*, *A.ochraceus*, *A.flavus*, *A.versicolor* ve *A.tamari*, %16 yı aşması

durumlarında ise *Penicillium* türleri predominant olarak üremektedirler (9,24,32,52).

1.2.1.3. Atmosfer Bileşimi

Aerobik mikroorganizmalardan olan küf mantarları, üremek ve toksin sentezleyebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte, O₂ oranı düşük ve CO₂ oranı yüksek olan mikroaerofilik besi şartlarında da ürerler. Ortamın CO₂ oranı %20'e çıktığında, aflatoksin üretimi optimum sıcaklık ve nem koşullarında üretilen aflatoksin miktarının % 75'ine düşmektedir. Ortamın O₂ düzeyi %40 ve daha aşağılara düştüğünde, *A.flavus*un gelişimi, buna bağlı olarak da aflatoksin oluşumu önemli derecede azalmakta, hatta %1 in altında tamamen durmaktadır. Bunun yanında, ortamdaki CO₂ düzeyi %60 'a eriştiğinde aflatoksin oluşumu tamamen durmaktadır (6,21,48,83). Yer fıstığında aflatoksin oluşumu %20 CO₂ ve %5 O₂ düzeylerinde tamamen durmaktadır (54).Genellikle, mantar üremesi ve toksin oluşumu, CO₂ oranının artması ve O₂ oranının düşmesiyle azalmaktadır.

1.2.1.4. Mekanik Zedelenmeler

Tane yemlerin hasat, öğütme ve taşınma sırasında uğradığı mekanik zedelenmelerle etrafındaki koruyucu tabakanın paçalanması, mantarlarla bulaşma riskini artırmaktadır. Dolayısıyla, bu işlemler yapılırken olanaklar ölçüsünde az hasara sebep olan tekniklerin seçilmesi gerekmektedir.

1.2.2.Kimyasal Faktörler

1.2.2.1. pH Değeri

Küf mantarları, farklı pH ortamlarında üremekle birlikte, asidik ortamları tercih etmektedirler. Genellikle, pH 2.0-8.5 değerleri arasında etkinlik gösterebildiklerinden, hemen her türlü yem maddesinde ürerler. Ancak, çoğu türler için optimum pH düzeyi 4.5-6.5 arasındadır. Bununla birlikte, 2.0-8.0 pH değerleri arasında da aflatoksin oluşumu görülebilir (6,54,83).

İz elementlerden Cu, Fe, Mn, Mg,Zn mikotoksin oluşumu üzerine etkilidir (54). Bunlardan Zn esansiyel bir element olup, Jones ve ark. (46) tarafından yapılan bir çalışmada, Zn oranı ile Aflatoksin düzeyi arasında pozitif bir ilişki olduğu ortaya konmuştur.

1.2.2.2.Yemlerdeki Besin Maddeleri

Mantarlar klorofilsiz olduğundan fotosentez yapamazlar. Bu nedenle, besin gereksinimlerini dışarıdan karşılamak zorundadırlar. Mantarların karbon kaynağını öncelikle alkol, karbonhidratlar, organik asitler; azot kaynağını da üre, amonyum tuzları, proteinler, peptonlar, peptitler, aminoasitler gibi bileşikler oluşturmaktadır. Besi yerine karbon kaynağı olarak %5-10 glikoz, %6-15 fruktoz, %2.5-8.5 sakkaroz katılması toksin oluşumu üzerine olumlu yönde etki göstermekte, bu miktarların artırılması ise, osmotik basıncı yükselttiği için, mantar ve toksin oluşumunu olumsuz yönde etkilemektedir (6,47,54).

1.3.Yemlerde Toksinlerin Oluşumu

Yemlerde doğal mikotoksin kontaminasyonu, daha çok tropik ve

subtropik ülkelerde söz konusudur. Başta yer fıstığı küspesi olmak üzere, pek çok küspeler de doğal kontaminasyon açısından risk taşımaktadırlar. En çok doğal toksin oluşumu görülen yemler aşağıda verilmiştir (19,20).

1-Tahıllar ve Yan Ürünleri: Mısır, pirinç, arpa, yulaf, darı, sorgum, buğday, buğday unu

2-Tohumlar ve Yan Ürünleri: Yer fıstığı, yer fıstığı unu, kuru bezelye, bezelye unu, soya fasülyesi, soya yağı, pamuk tohumu, fındık, susam

3-Diğer Ürünler: Kurutulmuş patates, manyok, balık unu, yeşil yem unları ve karma yemler.

Yem ve yem hammaddelerinin cinsi, küf mantarlarının gelişmesi ve toksin oluşumunda etkili olmaktadır. Bununla birlikte, aflatoksin oluşumunda bir substrat bağımlılığı yoktur. Nitekim, *A. flavus* ve *A.parasiticus* tarafından salgılanan aflatoksinler doğal olarak yerfıstığı ve tahıllarda oluşmakta ve daha çok kanatlı hayvanlar ile sığır ve insanlarda etkili olmaktadır (6,19,20,27,). *A.ochraceus* ve *P.viridicatum* tarafından üretilen okratoksin ise, mısır ve arpa gibi tane yemlerde doğal kontaminasyona sebep olmakta ve kanatlılarda olumsuz etkiler oluşturmaktadır (6,18,19,21,52). Mikotoksinler, öncelikle tahıl ve tahıl yan ürünleri ile yağlı tohum ve yan ürünlerinde gelişmektedir.

Fusarium, *Aspergillus* ve *Penicillium* küflerinin mikotoksin üretme açısından önemli bir yere sahip olduğu belirtilmektedir (19,21,52,54). Aflatoksin ve okratoksin salgılayan küf mantarları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (22,35)

Tablo 3: Aflatoksin ve okratosin üreten küf mantarları

Toksin Türü	Toksin Üreten Küf Mantarları	
Aflatoksinler	A.flavus	A.puberulum
	A.parasiticus	A.ochraceus
	A.niger	P.variable
	A.wentii	P.citrinum
	A.ruber	Rhizopus spp.
	A.ostianus	
Okratoksinler	A.ochraceus	P.viricatum
	A.sulphureus	P.commune
	A.sclerotium	P.cylclonium
	A.alliaceus	P.variable
	A.melleus	P.purgurescens
	A.ostianus	P.palitanus
	A.petrakii	

1.4. Mikotoksikozislerin Klinik Belirtileri

Büyük bir çoğunluğu organizmaya sindirim sisteminden giren mikotoksinlerin düşük miktarları bile hastalıklara, hatta ölümlere yol açabilmektedirler. Yüksek düzeyleri akut mikotoksikozisleri oluştururken, düşük düzeyleri de devamlı alındığında, kronik mikotoksikozislere sebep olmaktadır (8,23,67). Yemlerde 10-100 ppm arasındaki aflatoksin

düzeyleri evcil hayvanların çoğunda akut zehirlenmelere, 20 ppb veya düşük düzeyleri ise kronik zehirlenmelere yol açabilmektedir (8,83).

1.4.1. Aflatoksikozisin Klinik Belirtileri

1.4.1.1. Akut aflatoksikozis

Aflatoksinlerin gücü ve karsinojenitesi, alınma dozu, alınma süresi, hayvanın yaşı ve beslenme durumuna göre değişmektedir (25). Genelde, 10-20 ppm düzeylerde toksin alımından sonra hayvanlarda hepatit, hemorrajik, nefrit, mukoza nekrozu gibi belirtiler, hatta ölümler görülmektedir (54,60). Nitekim, yapılan çalışmalarda, 390 ppb düzeyinde aflatoksin katılan rasyonlar 8 hafta süre ile civcivlere verilmiş, civcivlerin kalp, karaciğer ve pankreası incelenmiş, en fazla tahribatın karaciğerde olduğu belirtilmiştir (51,74). Yine, bir başka çalışmada, yüksek düzeyde aflatoksinin karaciğerde yağlanmaya neden olduğu, 10 ppm lik bir aflatoksin düzeyinin de karaciğer nekrozu ve ölüm gibi belirtilere sebep olduğu tespit edilmiştir (38).

Gençlerde hastalığın akut formunda ana belirtiler olarak iştahsızlık, uykusuzluk, gaz oluşumu, mantarların beyine yerleşmesiyle de bir takım konvülsiyonlar, oküler enfeksiyonlar, gelişme geriliği, göz kapaklarının enfeksiyonu, konjunktival kesede eksudat birikimi gibi belirtiler görülebilmektedir (48,59).

Aflatoksikozisin başlangıç tablosunda, isteksizlik, zayıflık ve kas titremeleri gibi belirtiler göze çarpmakta, vücut sıcaklığı 1,5 °C kadar normal değerlerin üzerine çıkabilmekte, daha sonraları ise 1-2 °C normal değerlerin altına düşebilmektedir. Hastalığın ileri dönemlerinde ise sarılık, kanama, ataksi, kramplar, hatta 24-30 saat içinde ölüm gibi

patolojik tablolar görülebilmektedir (6,8,39). Civciv, ördek, hindi palazı gibi hayvanlar kullanılarak yapılan deneysel çalışmaların hemen hepsinde, alınan aflatoksin düzeyine bağlı olarak 7 ay ile 5,5 yıl arasında karaciğer kanseri şekillenmiştir (82).

Civciv yeminde 0.75 ppm aflatoksin düzeyi, büyümenin gerilemesi ile yağlı karaciğer sendromu, 1 ppm düzeyi ise karaciğer nekrozu ve hemoraji gibi belirtilere neden olmaktadır (67,83).

Birçok hayvan türünde böbrek, kolon, akciğer ve gözyaşı bezleri gibi organlarda kanseröz karakterli lezyonlara rastlanılmıştır (10,48,49,67). Aflatoksin ve metabolitleri, plasenta ve süt yolu ile geçerek, malformasyonlara da neden olabilmektedir. Aflatoksin fraksiyonlarının ördek palazlarında toksisiteleri ppm üzerinden, Aflatoksin B₁ 18.2, Aflatoksin B₂ 84.8, Aflatoksin G₁ 39.2, Aflatoksin G₂ 172.5, civcivlerde ise Aflatoksin B₁ 0.36 Aflatoksin B₂ 0.80, Aflatoksin G₁ 1.70, Aflatoksin G₂ 2.50 olarak tespit edilmiştir (8,48,49). Aynı olgu evcil ördek, ada tavşanı, kedi, köpek, sıçan, erkek ve dişi rat ile alabalık için, sırasıyla, 0.34-6,5, 0.30, 0.55, 1.00, 9.00, 7.20, 17.90 ve 0.81 dir (8,48,54). Hayvanlar arasında görülen toksisite farklılıkları, metabolizma ve atım mekanizmalarının farklılığına bağlanmaktadır (8,48,54).

Hayvanların çoğunda LD₅₀ düzeylerinin 0.5-10 ppm arasında olduğu ortaya konmuştur (48,68,78).

1.4.1.2. Kronik Aflatoksikozis

Bu klinik tablo, düşük düzeyli toksin alımıyla oluştuğu gibi, akut aflatoksikozun atlatılmasından sonra da görülebilmektedir. Hayvanlarda

gelişmenin duraklaması, yem etkinliğinin ve hastalıklara karşı direncin azalması en sık rastlanan klinik belirtilerdir. Ancak, kronik aflatoksikozisin immunogeneziste bozukluklar,repordüktif etkinlikte azalma, direnç düşüklüğü, canlı ağırlık kaybı, yumurta veriminde düşme gibi belirtilere de neden olduğu tespit edilmiştir (12,17,25,33,34,36,48,67,86). Ayrıca, aflatoksin kanatlılarda, koksidiyoz, marek hastalığı (26,33,36), aspergillozis, salmonellozis ve enfeksiyöz bursa hastalığı (18) gibi hastalıkların şiddetini artırmaktadır. Yine, laboratuvar ve tarla şartlarında beslenen tavuklarda aflatoksin vücuttaki karotenoit seviyesini de düşürmektedir (67,75,88,90).

Aflatoksinler, kandaki kalsiyumu azalttığı ve D vitamini ile aflatoksikoz arasında interaksiyon bulunduğu için, rasyondaki sınırlı vitamin D düzeyinden dolayı aflatoksin raşitizme neden olmaktadır. Öte yandan, bazen böbreklerde ürat kristalleri birikmektedir (40,52).

Smith ve ark. (78), kanatlı gemine 10 ppm aflatoksin ilave ederek yaptıkları çalışmada, büyüme oranının yarı yarıya azaldığını, yemden yararlanma derecesinin düştüğünü, ölüm oranının %25 kadar olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, bu arada aflatoksinle birlikte yeme aeuromisin ilavesinde canlı ağırlık artışının aflatoksinli gruba göre daha az düştüğünü, ölüm oranının %12 oranında meydana geldiğini saptamışlardır.

Yumurta tavuğu gemlerinde 4-10 ppm arasında aflatoksin bulunması, yumurta veriminde azalma, 10 ppm düzeyinde olması halinde ise karaciğer nekrozu ve ölümler gibi sonuçlar doğurmaktadır (67). Nitekim, yapılan bir çalışmada, aflatoksinli yemlerle beslenen tavuklarda yumurta veriminin düştüğü, fakat yumurta ölçülerinde değişiklik olmadığı, bu tür yumurtaların tüketilmesinin insan sağlığını tehdit ettiği, karaciğerin 2-3 katı kadar büyüdüğü ve renginin solgun ve peteşiel kanamaların olduğunu,

safra yolunda da hiperplazinin görüldüğü tespit edilmiştir (76).

Hamilton ve Garlich (38), yemdeki aflatoksin düzeyinin 2,5 ppm kadar olmasının yumurta verimini önemli oranda, 10 ppm kadar olmasının yumurta verimini %50 oranında düşürdüğünü, 20 ppm kadar olmasının ise yumurta verimini tamamen azalttığını tespit etmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar, 101 ppm düzeyinde aflatoksin içeren mısırın 2 gün süre ile tavuklara yedirilmesi sonucu, 1000 tavuktan 493 nün ölümüne, geri kalanında ise yumurta veriminin %5'e düşmesine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Piliç yeminde 1.5-2.5 ppm düzeyinde aflatoksin bulunması, canlı ağırlık artışında azalmaya neden olmaktadır (83). Rasyonlarında yonca unu ve *A. niger myceliumu* içeren besi piliçleri ile yapılan bir çalışmada (31), adı geçen katkının rasyondaki oranı arttıkça yem etkinliğinin düştüğü, buna karşılık bağırsak uzunluğu ve ağırlığının arttığı, mukozasının zarara uğradığı ve immun sistemin etkilendiği ortaya konmuştur.

1.4.2. Okratoksinlerin Klinik Belirtileri

Okratoksin A, tek başına veya sitrinin ile birlikte böbreklerde patolojik bozukluklara sebep olabilmektedir. Hastalık, böbreklerde tubuler epitelyum dejenerasyonu ve fonksiyon bozukluğu ile kendini göstermektedir. Hepatotoksik bir nitelik taşıyan okratoksinin, kemik iliği ve lenf sistemi aktivitesinin düşmesine veya lenfoit dokunun nekrozuna neden olduğu belirtilmektedir (8,29,48,49,62).

Akut okratoksin zehirlenmesinde tremor, refleks kaybı, diyare ve ölüm meydana gelebilmektedir. Okratoksinle zehirlenmiş hindilerin böbreklerinde, dejeneratif değişiklik, solgunluk gibi belirtilerin dikkati çektiği belirtilmektedir (67). Rasyonla 2 ppm okratoksin A alan tavuklarda

yumurta üretimi ve canlı ağırlık kaybı görülmüştür (68). Öte yandan, etlik piliçlere 3 hafta yemle 0.5-1 ppm düzeyinde verilen okratoksinin olumsuz etkisi görülmezken, 0.6 ppm lik bir düzeyin 6 hafta veya daha fazla süreyle verilmesi ile tavuklarda yem tüketimi ve yumurta verimi azalmıştır (48,49).

Micco ve ark. (62), besi piliçleri ile yumurta tavuklarında yaptıkları bir araştırmada, karaciğer okratoksin birikintilerinin besi piliçlerinde (11 ppb) yumurta tavuklarına (1.5 ppb) göre daha fazla olduğunu, böbreklerde ise, besi piliçlerinde (0.8 ppb) yumurta tavuklarına (5.8 ppb) oranla daha fazla olduğunu, okratoksin A'nın karaciğer ve böbrek için selektif organ olduklarını belirtmişlerdir.

Okratoksinin düşük düzeylerde, fakat sürekli alınması hayvanlarda gelişememe, zayıflama ve verim düşüklükleri meydana getirmekte ve böbrek, kalp, karaciğer ve dalak gibi iç organlarda ürik asit birikimleri, leukopenia ve hematokrit değerlerinde düşme, gibi patolojik durumlara yol açmaktadır (41,48,49). Toksinin, piliçlerde seksüel olgunlaşmayı geciktirip yumurta üretimini azalttığı (41,62), okratoksin A ve C'nin günlük ördek ve civcivlerde karaciğer, böbrek ve proventrikulusta kanamalara, etlik civcivlerde ise belirgin şekilde gelişme geriliği ile böbreklerde büyümeye sebep olduğu tespit edilmiştir. (49).

1.5. Mikotoksikozislerin Teşhisi

Mikotoksin zehirlenmeleri, çevre faktörleri ve etkilenen hayvana göre, önemli ölçüde değişmekte ve genellikle sporadik olarak görülmektedir. Akut zehirlenmelerin tanısı kolayca belirlenebilmekte ise de, kronik olayların tanısı genel semptomlarla seyrettiğinde çok zor olmakta, hatta zaman zaman gözden kaçabilmektedir. Bu nedenle, kronik

zehirlenmelerin tanısı için laboratuvar analizlerinin yanında, hekim ile işletmecilerin işbirliği de önem taşımaktadır. Bu amaçla, hekimin işletmecilerden hayvansal üretim, yemleme tekniğinin biçimi, ürün kaldırma sırasında iklim koşulları, yemlerin depolanma şekli ve süresi, ilgili dönemde ve yerde ortaya çıkan kitlesel hastalıklar gibi konularda iyi bir anemnez alması gerekmektedir (6,8,28,52,54).

Hastalık sebebinin kolay belirlenememesi, bulaşıcı olmaması, bağışıklık sisteminin uyarılmaması, uygulanan terapötik sağıtımın az etkili olması, olayların genellikle mevsimsel oluşu, mikotoksinlerin ortak yönlerindendir (8).

Hastalık, toksin varlığının ortaya konmasıyla, benzer patolojik bozukluklar gösteren hemorajik ve septisemik hastalıklardan ayırt edilebilir. Toksin varlığını belirleyen çeşitli analiz metotları geliştirilmiştir (1,19,43,55,58,91). Bunun yanında, şüpheli yemlerden hazırlanan ekstraktlar ördek palazlarına ve alabalıklara yedirilerek hayvanlardaki klinik belirtiler ile otopsi bulgularının incelenmesi, ördek ve tavuk embriyolarında toksisite denemelerinin yapılması, doku kültürlerine ekimler yapılarak hücre dejenerasyonlarının incelenmesi hastalık tanısında ilgililerin kesin yargıya varmalarına yardımcı olacaktır (40).

Yemleri küf mantarı invazyonlarından korumak için, hasat anındaki iklim koşullarının yağışlı ve nemli olmamasına, depo şartlarının uygun olmasına, depolama süresinin kısa tutulmasına dikkat edilmesi dışında, yemlere küf inhibitörleri de katılabilir. Nitekim, Brake ve ark. (15), yemlere küf inhibitörü katarak yaptıkları bir çalışmada, küf üremesinde azalma görüldüğünü tespit etmişlerdir.

1.6. Mikotoksin İçeren Yemlerle Zehirlenme

Aflatoksinin letal potansiyeli, hindi, ördek ve piliç gibi hayvanlarda zarara yol açan etiyolojik ajanın bulunmasından, yani toksinin keşfinden sonra belirlenmiştir (76). Aflatoksin içeren rasyonlarla beslenen ineklerin sütünden ördeklere verilmiş ve bunlar üzerindeki toksisite kaydedilmiştir (23). Başka bir araştırmada da (77), 6 hafta boyunca per os olarak uygulanan aflatoksin veya metabolitleri, 45 besi piliçinden 15 inde bulunmuştur. Buna karşılık, Platonow (68), 6 hafta boyunca 31 ppm aflatoksin içeren yemle beslenen broylerlerde, göğüs ve bacak etlerinde veya karaciğerlerinde, aflatoksin ekstraktı veya bunların metabolitlerinin olmadığını ortaya koymuştur.

Aflatoksine karşı tepkide, hayvanlar arasında, hatta aynı hayvan türü içinde bile, farklılıklar görülmektedir. Nitekim, yemleri ile 200 ppb düzeyinde Aflatoksin alan besi piliçlerinde canlı ağırlık artışının azaldığı ve karaciğer lezyonlarının şekillendiği gözlenirken, yumurta tavuklarının 33 hafta süre yemleri ile 610 ppb Aflatoksin almalarına rağmen etkilenmedikleri görülmüştür (8). Yine, 0.5 (16) ve 0.75 ppm aflatoksin içeren rasyonlarla beslenen tavukların yumurtalarında adı geçen toksine rastlanmadığı, fakat 0.4 ppm aflatoksinli yemlerle ad libitum beslenen yumurta tavuklarında aflatoksin bulunduğu tespit edilmiştir (76).

Archibald ve ark (5), düzeyi bilinmeyen aflatoksinle bulaşmış yer fıstığı küspesiyle beslenen besi piliçlerinin iki hafta boyunca enfekte olmadıklarını gözlemişlerdir. Farklı düzeylerde aflatoksinle bulaşık yemle beslenen piliçlerde doz düzeyine bağlı olarak vücut ağırlığı değişmektedir (17,23,32). New Hampshire piliçlerine 0.5 ppm ve 0.75 ppm

lik toksik yem verilerek yürütülen bir araştırmada karaciğer ve plazma enzim değerlerinin değiştiği, hemoglobın değerlerinin düştüğü ve hipoproteinemi geliştiği, karaciğer Se konsantrasyonu önemli derecede artmakla birlikte, konjeste böbreklerin varlığı ortaya konmuştur (77).

Günlük civcivlerin 3 hafta boyunca, yemlerine 1.36 ppm, total karotenoit ve 25 ppm serbest lutein yanında 0, 1, 2, 4, 8 ppm şeklinde aflatoksin eklenerek yapılan bir çalışmada (90) aflatoksin jejunal mukoza içeriğini ve serum lutein oranını %70 den %35 lere düşürdüğü, buna karşılık karaciğer monoeter miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Bir başka araştırmada da, besi piliçlerinde aflatoksinle bulaşık yemlerin tüketimi ile toksikozis şekillendiği, hindi palazlarının daha hassas olduğu ve buna bağlı olarak da, 3 hafta süreyle 1 ppm aflatoksini yemle alanlarda %50 lik bir ölümün gerçekleştiği görülmüştür (36).

Gibson ve Bailey (33), yaptıkları bir çalışmada, yemlerine 4 ppm Okratoksin A katılan tavuklarda canlı ağırlık artışı ve yem etkinliği kontrol grubuna göre daha düşük çıkmıştır.

1.7. Aflatoksin ve Okratoksinlerin

Doku ve Organlardaki Birikintileri

İzotop C^{14} kullanılarak hayvanlara aflatoksin verildiğinde, bunun %25-30 nun CO_2 ye çevrildiği, %25 nin idrar, %25 nin dışkı ile atıldığı, %6-9 nun da karaciğerde bulunduğu tespit edilmiştir (8,49). İşaretlenmiş (C^{14}) aflatoksinle yapılan diğer bir araştırmada civcivlere 14 gün süreyle verilen aflatoksinin, toksik bir etki yapmadığı görülmüş, yemle alınan C^{14} ün %90.64 nün dışkı ile atıldığı, organizmada tutulan miktarın ise %11.4 nün kanda, %12.58 nin kursakta, %31.66 nın göğüste, %30.63 nün

bacakta, %9.83 nün karaciğerde, %4.9 nun da kalp kasında biriktiği belirlenmiştir (57). Piliçler üzerinde yapılan benzeri bir çalışmada da en yüksek birikintinin safra, karaciğer ve üreme organlarında olduğu bildirilmiştir (73). Kanatlılarda yemlerle alınan toksin düzeyinin yaklaşık %0.5 i yumurtaya geçmektedir. Nitekim, 100-200 ppm arasında Aflatoksin B₁ ile bulaşık yem yiyen kanatlıların yumurtalarına 0.2-2.3 ppb aflatoksin geçmektedir (49).

1.8. Yasal Düzenlemeler

Gerek hayvanlardaki, gerekse hayvansal ürünlerle geçtiği insanlardaki Aflatoksin B₁'in yol açabileceği akut, kronik ve karsinojenik etki risklerini ortadan kaldırmak amacıyla, yem ve yem hammadelerinde bulunabilecek maksimum mikotoksin düzeyleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (49).

Tablo 4: Çeşitli ülkelerdeki bazı yemlerde
bulunabilecek maksimum Aflatoksin B₁ düzeyleri, ppb

Ülke	Ürün Çeşidi	Aflatoksin B ₁
Belçika	Karma yemler	40
Kanada	Yemler	100
Fransa	Yemler	50-59
	Süt yemleri	20
Hindistan	Yer fıstığı ekstreleri	120
İsrail	Yemler	20
İtalya	Yer fıstıkları	50
Polonya	İnsan ve hayvan tüketimi için	
	İthal ürünler	5
Amerika	Yemler	20
Rusya	Fıstık ve yağlı tohumlar	
	Tahıllarda dahil diğer ürünler	2,5
Almanya	Sığır yemleri	50
	Dana ve koyun yemleri	10
	Kanatlı yemleri	10

Avrupa Ekonomik Topluluğunca (89) benimsenen Aflatoksin B₁ in tolerans limitlerine göre; yem hammadeleri 200 ppb, sığır, koyun, keçi besi yemleri 50 ppb, ergin kanatlı karma yemleri 20 ppb, buzağı, civciv, kuzu gibi genç hayvanlar ile süt ineği verilen karma yemleri 10 ppb den fazla aflatoksin içermemelidir.

Ülkemizde ise (3), 1990 yılında aflatoksin kontroluna ilişkin yayınlanan yönetmelikte, Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ den oluşan toplam aflatoksinin üst sınırı düzeyi olarak, karma yemler için 50 ppb biçiminde kabul edilmiştir.

Bazı ülkelerde analizlenen yem ve besinlerde okratoksine raslantı sıklığı ve okratoksin düzeyi ise ppb olarak şöyledir: Amerika 42/1604, iz düzey-16000, Kanada 28/132, 20-27000, Danimarka 23/83, 9-27590, Fransa 14/538, 15-200, Yugoslavya 58/341, 45-51000 ve Polonya 8/150, 50-200 dir (92).



2. MATERİYAL VE METOT

2.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak yem fabrikalarından, çiftliklerden ve yemliklerden alınan toplam 101 adet yem hammaddesi ve karma yem kullanılmıştır (Tablo 5). Bunlardan 45 i hammadde, 56 sı ise karma yemdir.

Tablo 5: Yemlerin tip ve kökenleri (Adet)

Yemlerin tipleri	Fabrika kökenli	İşletme kökenli
i)Yem Hammaddeleri		
Mısır	8	-
Buğday	6	-
Arpa	6	-
SFK	7	-
Balık unu	6	-
PTK	6	-
Et-Kemik unu	6	-
ii)Karma Yemler		
Etlik civciv yemi	3	5
Yumurta civciv yemi	2	6
Piliç büyütme yemi	2	8
Piliç geliştirme yemi	4	6
Etlik piliç yemi	2	5
Yumurta Tavuğu I.Dönem	2	4
Yumurta Tavuğu II.Dönem	1	6
Toplam	61	40

SFK : Soya fasülyesi küspesi

PTK : Pamuk tohumu küspesi

Örnekler fabrikalarda yığın ve torbalardan, çiftliklerde ise yığın, torba ve yemliklerden alınmıştır. Örnek almada klasik kaynaklardan yararlanılmıştır (4,61,71). Yem örnekleri laboratuvara ulaşır ulaşmaz

Tablo 6 : Yığın, torba ve yemliklerden alınan örneklerin sayısal dağılımı

Yemlerin tipi	Yığın	%	Torba	%	Yemlik	%	Toplam
i) Yem Hammaddeleri							
Mısır	6	75	2	25	-	-	8
Buğday	6	100	-	-	-	-	6
Arpa	6	100	-	-	-	-	6
SFK	2	28.57	5	71.42	-	-	7
Balık unu	-	-	6	100	-	-	6
PTK	2	33.3	4	66.66	-	-	6
Et-Kemik unu	-	-	6	100	-	-	6
ii) Karma Yemler							
Etlik civciv yemi	1	12.5	3	37.50	4	50.0	8
Yumurta civciv yemi	-	-	3	37.50	5	62.50	8
Piliç büyütme yemi	1	10	5	50.0	4	40.0	10
Piliç geliştirme yemi	-	-	5	50.0	5	50.0	10
Etlik piliç yemi	3	42.86	1	14.28	3	42.86	7
Yumurta yemi I.dönem	1	16.66	2	33.33	3	50.0	6
Yumurta yemi II.dönem	1	14.28	1	14.28	5	71.42	7
Toplam	29	28.71	43	42.57	29	28.71	101

analiz edilmeye çalışılmış, analiz edilemeyen örnekler derin dondurucuda saklanmış, ardından ilgili parametreler yönünden

elverdiğince hızla analizlenmiştir.

Yığın, torba ve yemliklerden alınan örneklerin sayıları yukarıdaki tabloda sunulmuştur.

2.2. Metot

2.2.1. Yem Örneklerinin Hazırlanması

Yem örnekleri laboratuvar değirmeninde öğütüldükten sonra analize hazır hale getirilmiştir (61,71).

2.2.2. Mikolojik Çalışmalar

2.2.2.1. Stok Süspansiyonunun Hazırlanması

Analize hazırlanmış yem örneklerinden 20 g alınarak steril bir erlen içerisine konulmuş, üzerine aşağıda bileşimi verilen çalkalama solüsyonundan 180 ml ilave edilerek 20 dakika çalkalanmış, böylece 10^{-1} lik solüsyon hazırlanmıştır (2,7).

Çalkalama Solüsyonu:

Tryptone	:	1,6 g
Sodium Chloride	:	8,5 g
Tween-80	:	2 damla
Distile su	:	1000,0 ml

2.2.2.2. Stok Yem Süspansiyonunun Sulandırılması

Stok yem süspansiyonunun 1 ml alınarak önceden otoklavda steril edilmiş ve içerisinde 9 ml çalkalama çözeltisi bulunan tüplere sırasıyla 1 ml aktararak 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 lük, yani 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} lik dilüsyonlar hazırlanmıştır (2,7).

2.2.2.3. Ekimlerin Yapılması

Total sayımda küf mantarı bakımından zengin olan karma yemler için, 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} , yoksul olan yem hammaddeleri için ise 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dilüsyonlar elde edilmiştir. Hazırlanan bu dilüsyonlardan, her örnek için 2 paralel olmak üzere, 1 ml alınarak steril petri kutularına konmuştur. Üzerine, yaklaşık 50°C ye kadar soğutulmuş ve içerisine Rose Bengal konup sterilize edilen Malt Extrakt Agar besi yeri ilave edilmiş, dilüsyon ile besi yerinin iyice homojenleşmesi için petriler sekiz çizdirilerek karıştırılmıştır. Petrilerdeki besi yerinin katılaşması için yaklaşık bir saat beklendikten sonra, 27°C lik rutubetli bir etüvde 3-5 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda petriler çıkarılarak koloni sayımları yapılmıştır (2,7).

Çalkalama çözeltisi ve besi yeri 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Besi yerine bakterilerin üremesini önlemek amacıyla geniş spektrumlu antibiyotiklerden klortetrasiklinden 40 mg/lt düzeyinde ilave edilmiştir. Ayrıca bazı mantarların hızlı üremelerini önlemek amacı ile Rose Bengal de eklenmiştir (2,6,84).

Malt Extract Agar Besi Yeri

Malt extract agar	:	30,0	g
Peptone	:	5,0	g
Agar	:	15,0	g
Distile su	:	1000,0	ml
pH	:	5,4	

2.2.2.4. Hesaplama

İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan petrilerde üreyen koloniler sayılarak her dilüsyon için ortalama değerler belirlenmiştir. Koloni sayımında, 20-100 arasındaki koloni sayıları esas alınarak bulunan değerler, seyreltme faktörünün ters logaritması ile çarpılarak stok yem süspansiyonundaki toplam mantar sayısı bulunmuştur.

Mantar sayısının hesaplanmasında aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (2,9):

$$N = \frac{1}{V} \cdot X \cdot D \quad X = N \cdot D$$

N : Orijinal çözeltideki mikroorganizma sayısı

X : Ortalama mikroorganizma sayısı

D : Dilüsyonun ters logaritması

V : Petri kutularına ekilen miktar

2.2.2.5. Küflerin İdentifikasyonu

İdentifikasyonda, küflerin morfolojik ve kültürel özelliklerinden yararlanılmıştır. Morfolojik inceleme, çıplak göz ve binoküler mikroskop ile yapılmıştır. Mikroskopik preparatların hazırlanmasında lam, lamel ve  zeden yararlanılmıştır.

Aspergillus ve Penicillium türleri için Czapek Agar, Fusarium türleri için Patates Dekstroz Agar (PDA), Rhizopus ve Mucorlar için Malt Ekstrakt Agar gibi selektif besi yerlerinden yararlanılmıştır. K f mantarlarının identifikasyonu Samson'a (72) göre yapılmıştır.

Czapek Agar Besi Yeri

Sodium nitrate	:	2,0	g
Potassium chloride	:	0,5	g
Magnesium glucerophosphate	:	0,5	g
Ferrous sulphate	:	0,01	g
Potassium sulphate	:	0,05	g
Sucrose	:	30,0	g
Agar	:	12,0	g
pH	:	6,8	

Patates Dekstroz Agar

Patates ekstrakt	:	4,0	g
Dekstroz	:	20,0	g
Agar	:	15,0	g
Distile su	:	1000,0	ml
pH	:	5,6	

Total sayım için ekim yapılan petrilerin farklı kolonilerinden spesifik agarlara 3 nokta ekim tekniği kullanılmış ve 27°C de 5 gün inkübasyon uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda Laktofenol Anilin Blue boyama tekniğinden yararlanılarak, mikroskopik yapı ve koloni morfolojisine göre edentifiye edilmiştir (6).

2.2.2.6. Laktofenol Anilin Blue Boyama Tekniği

Boya Bileşimi

Fenol kristal	:	20,0 g
Laktik asit	:	20,0 ml
Gliserin	:	40,0 ml
Distile su	:	20,0 ml
Pamuk mavisi		
Anilin Blue	:	0,05 g

Fenol, distile su içinde hafifçe ısıtılarak eritilmiş, ardından diğer maddeler katılıp boya hazırlanmıştır. Lam üzerine 1 damla alkol konduktan sonra, 1-2 damla anilin blue damlatılmış, daha sonra da küf kolonilerinin birkaç yerinden steril bir iğne ile materyal alınarak bu solüsyon üzerine konup, üzeri temiz bir lamel ile kapatılmıştır. Preparat önce, 100-200, sonra da 450-500 büyütme ile mikroskop altında incelenmiştir (6).

2.2.3. Toksin Analizleri

2.2.3.1 Aflatoksin Standardının Hazırlanması

1 mg standart aflatoksin 100 ml metanolde çözülmüş, çözeltinin konsantrasyonu mg/ml olarak hesaplanmıştır. Çözeltinin absoransı ölçülerek molar absorans aşağıdaki formülle hazırlanmıştır (4,29,84,85).

$$\Sigma = \frac{A \cdot MA \cdot 1000}{AF}$$

A : Ölçülen absorans değeri

MA: Aflatoksinin molekül ağırlığı

AF: Aflatoksinin konsantrasyonu, mg/ml

a. Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Kristal haldeki standart aflatoksin üzerine, konsantrasyonu 8-10m g/ml olacak şekilde, benzen-asetonitril (98+2) karışımı ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Ardından 330-370 nm arasındaki dalga boyları taranarak 350 nm civarındaki en yüksek absorans veren dalga boyunda çözeltinin absoransı ölçme konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (2,84).

$$\text{Konsantrasyon (mg/ml)} = \frac{A \cdot MA \cdot 1000}{\Sigma}$$

A : Ölçülen absorans değeri

MA: Aflatoksinin molekül ağırlığı

Σ : Molar absorbsiyon

b. Aflatoksin Rezolüsyon

Referans Standardının Hazırlanması

Bu standart, Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ nin tek tek hazırlandıkları konsantrasyonlarda olacak şekilde (0.5, 0.1, 0.5, 0.1 mg/ml) karıştırılıp Benzen-Asetonitril (98+2) ile seyreltilmesiyle elde edilmiştir (2,84).

c. İnce Tabaka Kromatografisi Aflatoksin

Standartlarının Hazırlanması ve Korunması

Aflatoksin stok standart çözeltisinin konsantrasyonu ve saflığı tespit edildikten sonra, her standartın bir kısmı uygulama için B₁ ve G₁ 0.5 mg/ml, aflatoksin B₂ ve G₂ için 0.1 mg/ml olacak şekilde seyreltilmiş ve ışığa karşı korunacak şekilde buzdolabına konmuştur.

2.2.3.2. Okratoksin A Standartının Hazırlanması

Yukarıdaki gibi, molar absorpsiyonu hesaplandıktan sonra, kristal haldeki standartın konsantrasyonu 40 mg/ml olacak şekilde Benzen+Asetik Asit (99+1) karışımında çözülmüş ve karıştırılmıştır. 333 nm de absorbansı tespit edildikten sonra yukarıdaki formüle göre konsantrasyonu belirlenmiş, bu solüsyondan da 1-5 mg/ml arasında farklı seyreltiler uygulama standartı olarak hazırlanmıştır (2).

2.2.3.3. Aflatoksinler ve Okratoksin A

İçin Ekstraksiyon ve Temizleme

Bu yöntemde hem aflatoksinlerin, hem de okratoksin A'nın birlikte ayrılması sağlanmıştır. 25 g örnek tartılarak 250 ml lik erlenlere konulmuştur. Üzerine 100 ml Metanol/Su (85+15), 1 ml 1N fosforik asit (H_3PO_4) ilave edilip, erlenin ağızları iyice kapatıldıktan sonra mekanik çalkalayıcıda 30 dakika çalkalanmıştır. Karışım süzülüp, filtrattan 50 ml ölçü silindirlerine alınmıştır. Alınan bu kısım da 250 ml lik ayırma hunilerine aktarılmış, üzerine %10 NaCl den 50 ml konularak karıştırılmış ve 25 ml hekzan bu karışım üzerine eklendikten sonra 1 dakika çalkalanmış, fazlar birbirinden tamamen ayrılana kadar bekletilmiştir. Ayrılardan sonra alt faz 250 ml lik ikinci bir ayırma hunisine aktarılmış ve üsteki hekzan fazı atılmıştır. Alınan bu kısım üzerine 25 ml diklorometan eklenerek bir dakika çalkalandıktan sonra fazların ayrılması için bekletilmiştir. Ayrılma işleminden sonra alt faz, içerisinde 5 g susuz sodyum sülfat bulunan filtre kağıdından evaporatör balonlarına süzülüp kalan üst faza tekrar 25 ml diklorometan ilave edilerek bir dakika çalkalanmış, ayrıldıktan sonra yine filtre kağıdından evaporatör balonuna süzülmüştür. Diklorometan ekstraktı evaporatörde 45°C de buharlaştırılmıştır (58,85).

2.2.3.4. Aflatoksin ve Okratoksin A İçin

Silika Jel Kolon Kromatografi

Kolonun dip kısmına biraz cam pamuk konularak iyice sıkıştırıldıktan

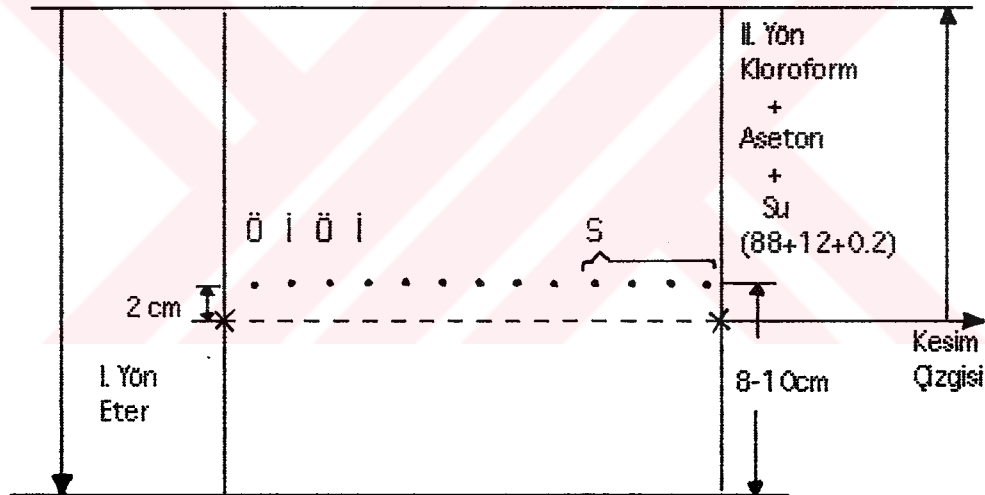
sonra, üzerine sırasıyla 0.5 g susuz sodyum sülfat , 0.5 g aktive edilmiş silika jel 60 (0.063-0.200 mm partikül boyu) , 0.5 g susuz sodyum sülfat eklenip hepsi ayrı ayrı sıkıştırılmıştır. Vakum pompası kullanılarak 3 ml hekzan, 3 ml diklorometan ile kolon yıkanmıştır (6 ml/dk). Bu arada, örnek ekstraktı 3 ml diklorometan ile sulandırılmış, kolona konularak süzölmüştür (3 ml/dk). Balon tekrar iki kez 1 ml diklorometan ile çalkanarak kolona eklendikten sonra süzölmüştür. Daha sonra kolon, sırası ile, 3 ml hekzan, 3 ml susuz dietileter ve 3 ml diklorometan ile yıkanmış (vakumlu, 6 ml/dk), ardından aflatoksinler için (90+10) oranında hazırlanan kloroform+aseton karışımından 2x3 ml kolona konularak kolon hemen viale alınmış ve süzülmesi için bekletilmiştir. Süzüntü azot gazı altında kurutulmuştur. Okratoksin A için ise, (90+10) oranında hazırlanan toluen+asetik asit karışımından diklorometan ile yıkandıktan sonra ilave edilip kolon viale alınmış ve 2x3 ml karışım süzölünceye kadar bekletilmiş ve süzüntü azot gazı altında kurutulmuştur (58,85).

2.2.3.5. İnce Tabaka Kromatografisi ile

Kalitatif Aflatoksin ve Okratoksin A Tayini

Bu amaçla hazır plakalar (Merck-5553) kullanılmıştır. Hazırlanan ekstraktlar, 200 µl benzen+asetonitril (98+2) karışımında çözüldükten sonra vial bir dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Vialden, örnek başına iki adet olmak üzere, Hamilton şırınga yardımı ile 10 µl plakanın 8-10 cm yukarısından, plakaya damlatılmıştır. Yine, iki örnekten birisinin üzerine 5 µl rezolüsyon standardı damlatılmıştır (internal standardı) Örnek ekstraktları 1 cm arayla tatbik edildikten sonra rezolüsyon standardı 1, 3, 5, 7, 10 µl olarak plakaya tatbik edilip kurutulmuştur. Daha sonra plaka geliştirme işlemine geçilmiştir. Plaka

önce 1.tankta eterde 1.yönde geliştirilmiştir. Tanktan çıkarıldıktan sonra 365 nm de uzun dalga UV ışık altında incelenmiş, beneklerin 2 cm altından işaretlenmiştir. Kirli kısım işaretlenen yerden çizilerek kesilip çıkarılmıştır. Daha sonra plaka kloroform+aseton+su (88+12+0,2) içeren geliştirme tankına eterde geri yürütmenin ters istikametinde 2.yönde konularak yaklaşık 40 dakika geliştirilmiştir. Bu işlemden sonra tanktan çıkarılan plaka kurutulmuştur. Plaka yine 365 nm uzun dalga UV ışık altında incelenmiştir. Örnek ekstraktlarına ait beneklerin R_f değeri ve rengi karşılaştırılarak ekstraktlarda aflatoksininin kalitatif tayini yapılmıştır (2,29,58,84).



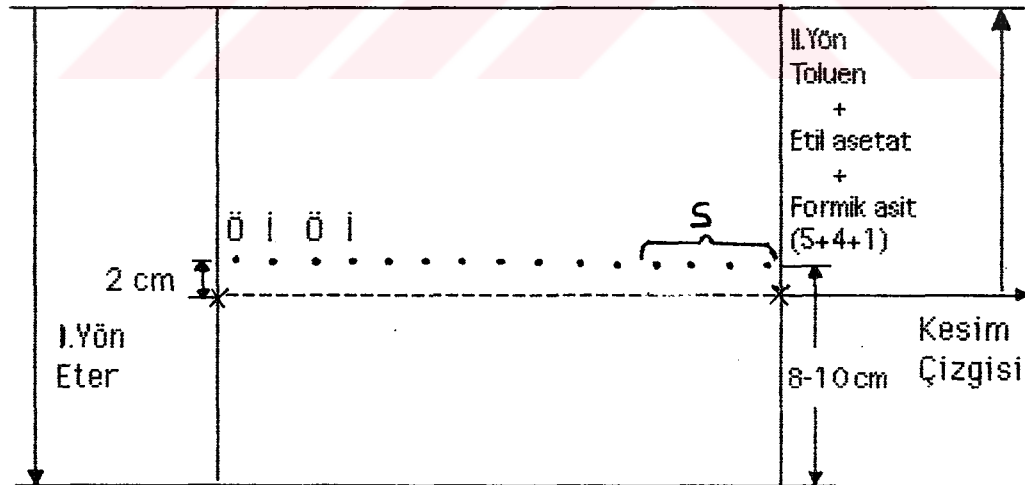
Ö : Örnek ekstrakt

İ : Örnek ekstrakt + rezolüsyon standardı

S : Rezolüsyon standardı

Şekil 3: Aflatoksinlerin tatbik işlemi

Okratoksin A için örnek ekstraktları 200 µl benzen +asetonitril (98+2) de çözölüp, 1 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından 10 µl ekstrakt Hamilton şırınga ile hazır plakalara iki örnek olarak tatbik edilmiştir. Örneklerden bir tanesinin üzerine 3 µl okratoksin standardı ilave edilerek internal standart elde edilmiştir. Örnek standartları bu şekilde 1 cm arayla tatbik edildikten sonra, standart 1,2,3 ve 5 µl olarak aynı hizada plakaya tatbik edilmiş ve kurutulmuştur. Yine, plaka 1.yönde susuz eterde geliştirildikten sonra 365 nm de UV ışılda incelenmiştir. Beneklerin yaklaşık 2 cm altından plaka işaretlenmiş ve kirli kısım işaretli yerden çizilerek kesilip çıkarılmıştır. Daha sonra plaka toluen+etil asetat+ formik asit (5+4+1) içeren geliştirme tankına eterde geri yürütmenin tersine 2.yönde konularak geliştirilmiş ve kurutulmuştur. Kuruyan plaka 365 nm de uzun dalga UV lamba ışığı altında incelenmiştir. Ekstraktlara ait beneklerin R_f değerleri ve rengi karşılaştırılarak, ekstartlarda okratoksin A içeriği incelenmiştir (84,85).



Ö : Örnek ekstraktı

İ : Örnek ekstraktı + Okratoksin A standardı

S : Okratoksin A standardı

Şekil 4: Okratoksin A nın tatbik işlemi

2.2.3.6. Doğrulama Testleri

a. Aflatoksinler

Aflatoksinlerin doğrulanmasında üç farklı yöntemden yararlanılmıştır (84,85).

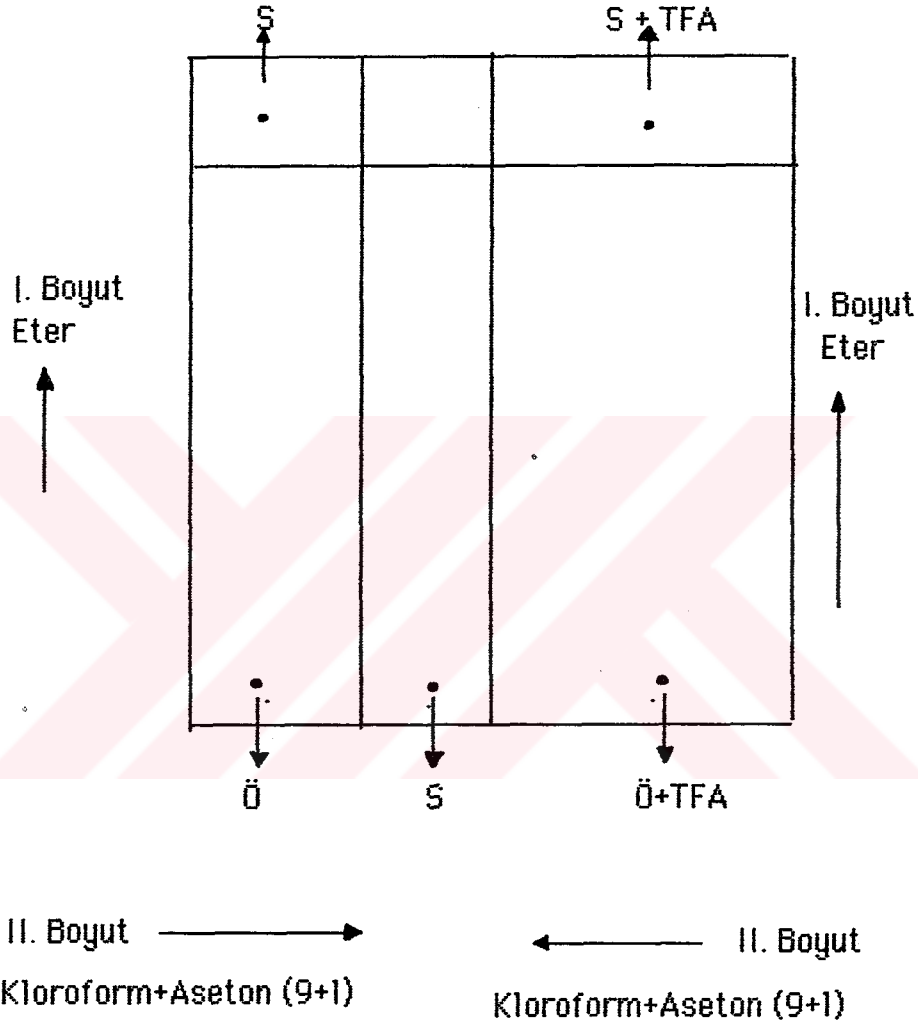
1.Yöntem: 365 nm uzun dalga UV ışığı altında görülen mavi floresans veren benek parlaklığı, 254 nm kısa dalga UV ışık altında görülen benek parlaklığından daha fazla ise, örnekte aflatoksin olabileceği düşünülmüştür.

2.Yöntem (Sülfirik Asit Testi): Kalitatif ince tabaka kromatografisi plakasında aflatoksin ihtimali olan benekler ve aflatoksin standartları üzerine atomizörle %25 lik H_2SO_4 ince zerreler halinde püskürtülmüştür ve kuruyana kadar bekletilmiştir. UV ışık altında 365 nm'de mavi floresans veren beneklerin parlak sarıya dönüşmesi, örnekte aflatoksin varlığını göstermiştir.

3.Yöntem (Triflor Asetik Asit Testi): (TFA) ten yararlanılarak yapılan bu doğrulama testinde örnek ekstraktı ve aflatoksin standardı plakaya simetrik olarak 8-10 cm yukarıdan tatbik edilmiştir. Bir tarafın üzeri kağıtla kapatılarak, diğer taraftaki beneklerin üzerine TFA damlatıldıktan sonra plakanın kuruması sağlanmıştır. Ardından plaka tek boyutta 1. yönde eterde, 2.yönde kloroform + aseton + su (88+12+0.2) içeren tankta geçirilmiştir. Tanktan çıkarılan plaka kurutulduktan sonra 365 nm de uzun dalga UV ışık altında incelenmiştir. TFA uygulanmayan kısımda reaksiyona girmemiş aflatoksinler plakanın üst kısmına yakın bir yere kadar ilerlemişken, TFA uygulanan kısımda reaksiyona giren aflatoksin B_1 ve G_1 in türevleri olan aflatoksin B_{2a} ve G_{2a} , aflatoksin B_1 ve G_1 in 1/4 üne yakın bir R_f değerinde görülmüştür. TFA uygulaması

sonucu Aflatoksin B₁ ve G₁'in türevleri olan B_{2a} ve G_{2b} nin varlığı
örnekte Aflatoksin B₁ ve G₁ varlığının kanıtı olarak kabul edilmiştir.

TFA uygulama şekli aşağıda verilmiştir.



Ö : Örnek ekstraktı
S : Aflatoksin standardı

Şekil 5 : TFA testinde örnek ekstraktının tatbik
şekli ve iki boyutlu geliştirme işlemi

b. Okratoksin A

Örnek ekstraktlarının plakaya tatbik şekli ve geliştirme işlemleri yapıldıktan sonra geniş bir cam kap içine NH_3 konarak, plaka ters çevrilip, NH_3 buharında 10 dakika bekletilmiştir. Ardından plaka NH_3 buharından alınarak 5 dakika karanlıkta bekletilmiş ve uzun dalga UV ışık altında 365 nm de incelenmiştir. Önce parlak yeşil floresans veren Okratoksin A beneklerinin NH_3 buharına tutulduktan sonra parlak mavi florens veren renge dönüşmesi, örneklerde Okratoksin A'nın varlığını doğrulamaktadır (84).

2.2.3.7. Aflatoksin ve Okratoksin A Miktarlarının Tayini

Örneklerde miktar tayini Perkin-Elmer MPF-43 A Fluorescence Spectrophotometer (densitometre) kullanılarak yapılmıştır.

a. Aflatoksinler

Ekstraktlardan aflatoksin varlığı için yapılan tatbik işlemi tekrar yapıldıktan sonra, rezolüsyon standart 1,3,5,10,20 μl olarak plakaya tatbik edilmiştir. İnce tabaka işleminden sonra plaklar 365 nm de uzun dalga UV lamba ışığı altında x, y konumları cetvelle belirlenmiştir. Densitometrenin floresans spektromu, excitation: 365 nm, emission: 420 nm ye ayarlanmıştır.

Konumları (x ve y) belirlenen standarda ait beneklerin koordinatları densitometre ayarlanarak, yazıcıdan pikleri elde edilmiştir. Aynı işlemler örnekler için de yapılarak yazıcıdan yine pikler elde edilmiştir. Her örnekteki aflatoksin miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (29,85).

$$\text{Aflatoksin, } \mu\text{g/kg (ppb)} = \frac{\text{B.S.Y.V.}}{\text{Z.E.M.}}$$

B : Örnekteki aflatoksin beneğine ait pik alanı, cm^2

S : Tatbik edilen standardın hacmi, μl

Y : Tatbik edilen standardın konsantrasyonu, $\mu\text{g/ml}$

V : Örnek ekstraktının son seyreltildiği hacim, ml

Z : Standart aflatoksinlerin pik alanlarının ortalaması, cm^2

E : Tatbik edilen örneğin hacmi, μl

M : Vialdeki ekstrakt eşdeğer olan örnek miktarı, g.

b. Okratoksin A

Toksin içeren örnek ekstraktları plakaya 10 μl , standartlar ise 1,2,3,5 ve 10 μl olarak tatbik edilmiştir. İnce tabaka kromatografi işlemi daha önce anlatıldığı (2.2.4.4) şekilde yapılmıştır. İnce tabaka kromatografi işleminden sonra plakalar kurutulmuş ardından beneklerin 365 nm de uzun dalga UV ışık altında x, y konumları bir cetvelle belirlenmiştir. Densitometrenin floresans spektrumu, exitation 325 nm, emission 457 nm ye ayarlanmıştır. Önce x, y konumları belirlenen standarda ait beneklerin koordinatları densitometrede ayarlanarak, pikler elde edilmiştir. Daha sonra örnek ekstraktındaki Okratoksin A ya ait x, y koordinatları sırasıyla densitometrede ayarlanarak pikleri elde edilmiştir. Örnekteki Okratoksin A miktarı, satandard pik boyları ile örnekteki toksin pik boyları karşılaştırılarak, örnek miktarı ve seyreltiler dikkate alınarak orantı yoluyla heplanmıştır.

2.2.3.8. Yöntemin Geri Alma Düzeylerinin Belirlenmesi

Geri alma çalışması aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ve Okratoksin A için sırasıyla, 0; 5; 10; 20 ppb geri alınacak şekilde, yem örneğine ilave edilip, iki paralel olarak analiz yapılmıştır.

2.2.3.9. İstatistiksel Analizler

Grup ortalamaları arasındaki karşılaştırmalar t testi , yemlerin depolanma süresi ve ham su düzeyleri arasındaki bağıntı korrelasyon testi ile kontrol edilmiştir (79).



3. BULGULAR

3.1. Örneklerde Ham Su Düzeyleri

Alınan 101 adet yem örneklerinde ham su düzeyleri tespit edilmiş olup, elde edilen değerler Tablo 7 de sunulmuştur. Tablodan da görüleceği üzere, hammaddeler ve karma yem t testiyle karşılaştırıldığında, gruplar ham su değerleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli çıkmıştır ($P<0.05$). Ham su düzeyi ortalama olarak yem hammaddeleri için %9.84, karma yemler için de %12.71 kadar bulunmuştur.

Tablo 7 : Yem hammaddeleri ve karma yemlerdeki ham su düzeyleri, %

Yemlerin tipi	Ham su düzeyi $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Örnek sayısı
i) Yem Hammaddeleri		
Mısır	12.08±1.68	8
Buğday	8.95±1.574	6
Arpa	8.55±1.66	6
SFK	10.31±1.36	7
Balık unu	10.52±1.22	6
PTK	9.69±2.47	6
Et-Kemik unu	8.80±1.659	6
Ortalama	9.84±1.242	-
ii)Karma Yemler		
Etlik civciv yemi	12.50±3.183	8
Yumurta civciv yemi	11.73±2.808	8
Piliç büyüme yemi	12.36±1.864	10
Piliç geliştirme yemi	13.49±4.05	10
Etlik piliç yemi	13.59±2.527	7
Yumurta yemi I.dönem	12.82±1.47	6
Yumurta yemi II.dönem	12.48±2.18	7
Ortalama	12.71±0.655	-
t	6.668 ^x	

x : $P<0.05$

3.2. Örneklerde Toplam Kûf Mantarı Sayısı

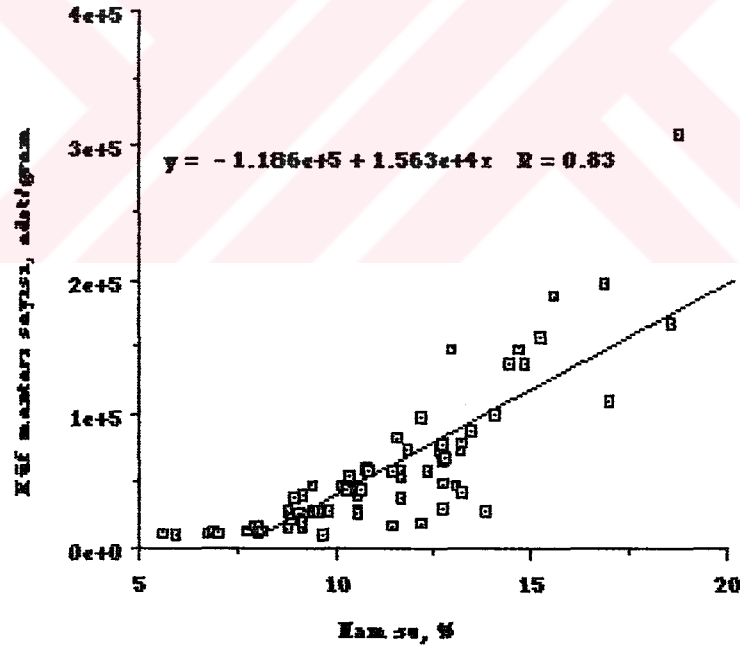
Fabrika ve işletmelerden alınan yemlerin gram örnek başına düşen toplam kûf mantarı sayıları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 8: Örnek alma yeri bakımından kûf mantarı sayıları, adet/g

Yemlerin tipi	Fabrika yemleri		İşletme yemleri		Toplam sayı
	Örnek sayısı	Küf mantarı sayısı	Örnek sayısı	Küf mantarı sayısı	
i)Yem Hammaddeleri					
Mısır	8	2.3x10 ⁴	-	-	8
Buğday	6	0.3x10 ⁴	-	-	6
Arpa	6	0.1x10 ⁴	-	-	6
SFK	7	1.3x10 ⁴	-	-	7
Balık unu	6	2.2x10 ⁴	-	-	6
PTK	6	4x10 ⁴	-	-	6
Et-Kemik unu	6	7x10 ⁴	-	-	6
Ortalama		1.0x10 ⁴	-	-	-
ii)Karma Yemler					
Etlik civciv yemi	3	1.8x10 ⁴	5	4.9x 10 ⁴	8
Yumurta civciv yemi	2	1.2x10 ⁴	6	3.2x10 ⁴	8
Piliç büyütme yemi	2	2.3x10 ⁴	8	5.0x10 ⁴	10
Piliç geliştirme yemi	4	3.0x10 ⁴	6	7.3x10 ⁴	10
Etlik piliç yemi	2	3.1x10 ⁴	5	9.5x10 ⁴	7
Yumurta yemi I.dönem	2	2.5x10 ⁴	4	5.4x10 ⁴	6
Yumurta yemi II.dönem	1	2.1x10 ⁴	6	4.2x10 ⁴	7
Ortalama		2.3x10 ⁴	-	5.6x10 ⁴	

Tablodan da izleneceği üzere, her bir gram örnek başına küf mantarı sayıları ortalama olarak, yem hammadeleri için 1.0×10^4 , karma yemler için 3.9×10^4 olarak bulunmuştur. Fabrika yemlerinde gram örnekte küf mantarı sayısı ortalama 2.2×10^4 , işletme yemlerinde ise 5.6×10^4 olarak tespit edilmiştir. Karma yemlerde en yüksek küf mantarı sayısı, her gram örnek için etlik piliç yemlerinden 9.5×10^4 düzeyinde bulunmuştur. En az küf sayısına ise hammaddelerden arpada ortalama 0.1×10^4 , fabrika yemlerinden yumurta civciv yeminde ortalama 1.2×10^4 , işletme yemlerinden, yumurta civciv yeminde ortalama 3.2×10^4 adet/g düzeyinde rastlanılmıştır.

Yemlerdeki mantar sayısı ile ham su düzeyi arasındaki bağıntı ($R=0.83$) aşağıdaki grafikte gösterilmektedir.



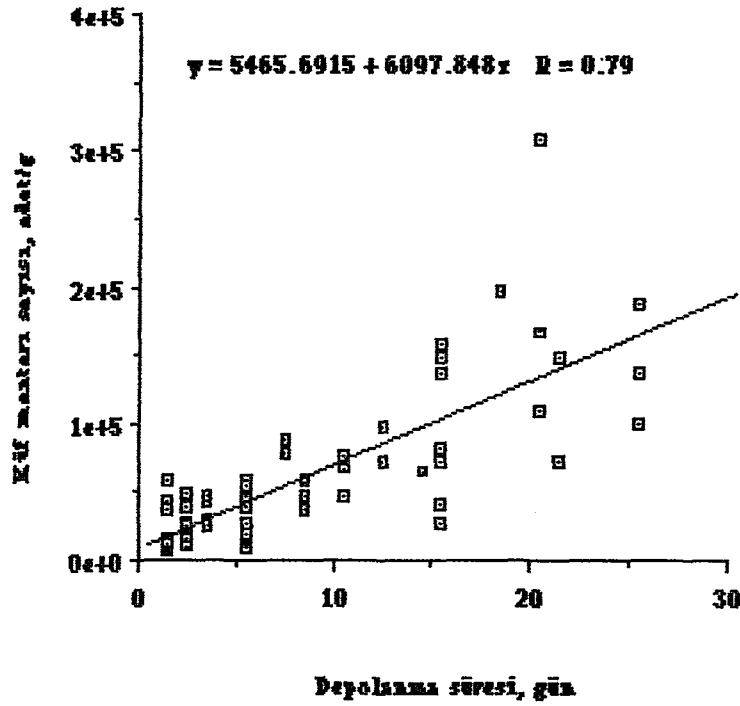
Şekil 6:Örneklerdeki ham su düzeyi ile küf mantarı sayısı arasındaki bağıntı

Yığın, torba ve yemliklerden alınan örneklerde küf mantarı sayıları Tablo'9 da gösterilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi torba, yığın ve yemlik örneklerine ilişkin ortalama küf mantarı sayıları sırasıyla, 1.5×10^4 , 3.0×10^4 ve 4.2×10^4 adet/g biçiminde bulunmuştur.

Tablo 9: Yığın, torba ve yemliklerden alınan örneklerde küf mantarı sayıları, adet/g

	Örnek sayısı	Küf mantarı sayısı
Yığın	29	3.0×10^4
Torba	43	1.5×10^4
Yemlik	29	4.2×10^4

Yemlerdeki küf mantarı sayısı ile depolanma süresi arasındaki bağıntı ($R=0.79$) aşağıdaki grafikte sunulmuştur.



Şekil 7: Depolama süresi ile küf mantarı arasındaki bağıntı

Yem tiplerine göre küf mantarı sayıları da Tablo 10 da gösterilmiştir. Tabloda görüleceği üzere, gram yemde 1.0×10^5 den fazla küf mantarı sayısına sadece iki etlik piliç örneğinde rastlanılmıştır.

Tablo 10 : Yem tiplerine göre mantar sayıları

Yem tipleri	Toplam Sayı	1001-10.000	%	10.001-50.000	%	50.001-100.000	%	>100.000	%
i)Ham Maddeler									
Mısır	8	4	50	4	50	-	-	-	-
Buğday	6	6	100	-	-	-	-	-	-
Arpa	6	6	100	-	-	-	-	-	-
SFK	7	1	14.28	6	85.71	-	-	-	-
Balık unu	6	1	16.66	5	83.33	-	-	-	-
PTK	6	6	100	-	-	-	-	-	-
Et-kemik unu	6	5	83.33	1	16.66	-	-	-	-
ii)Karma Yemler									
Etlik civciv yemi	8	2	25	6	75	-	-	-	-
Yumurta civciv yemi	8	3	37.5	4	50	1	12.5	-	-
Piliç büyütmeye yemi	10	2	20	4	40	2	20	-	-
Piliç geliştirme yemi	10	2	5	50	2	20	-	-	-
Etlik piliç yemi	7	-	-	3	42.85	4	57.14	2	28.57
Yumurta yemi 1.dönem	6	-	-	4	66.66	2	33.33	-	-
Yumurta yemi 2.dönem	7	1	14.28	4	57.14	2	28.57	-	-

3.3. K f Mantarı T rleri

Yem  rneklerinden identifiye edilen k f mantarları aŗağıdaki tabloda verilmiŗtir

Tablo 11 : Yemlerden identifiye edilen k f mantarları

K�f mantarları	�rnek sayısı	Pozitif �rnek sayısı	%
<i>A. candidus</i>	101	14	13.86
<i>A. glaucus</i>	101	13	12.87
<i>A. flavus</i>	101	25	24.75
<i>A. fumigatus</i>	101	14	8.91
<i>A. niger</i>	101	9	8.91
<i>A. ochraceus</i>	101	8	7.92
<i>A. parasiticus</i>	101	9	13.86
<i>A. terreus</i>	101	5	4.95
<i>A. versicolor</i>	101	8	7.92
<i>Penicillium spp.</i>	101	21	20.79
<i>Fusarium spp.</i>	101	35	34.65
<i>Rhizopus spp.</i>	101	34	33.66
<i>Mucor spp.</i>	101	32	31.68

Tabloda g r ld ė  gibi, toplam yemlerde *A.candidus* ve *A. parasiticus* %13.86, *A.glaucus* %12.87, *A.flavus* %24.75, *A.niger*, *A. fumigatus* %8.91, *A.ochraceus* ve *A.versicolor* %7.92 *A. terreus* % 4.95, *Penicillium spp.* %20.79, *Fusarium spp.* %34.65, *Rhizopus spp.* %33.66, *Mucor spp.* %31.68 oranında bulunmuŗtur.

Yığın, torba ve yemliklerden alınan örneklerde identifiye edilen küfler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 12: Yığın, torba ve yemliklerden alınan örneklerde identifiye edilen küf mantarları

Küf Mantarları	Örnek sayısı (Yığın)	Pozitif	%	Örnek sayısı (Torba)	Pozitif	%	Örnek sayısı (Yemlik)	Pozitif	%
<i>A. candidus</i>	29	1	3.45	43	9	20.93	29	4	13.79
<i>A. glaucus</i>	29	4	13.79	43	6	13.95	29	3	10.34
<i>A. flavus</i>	29	7	24.14	43	8	18.60	29	10	34.48
<i>A. fumigatus</i>	29	5	31.03	43	6	13.95	29	3	10.34
<i>A. niger</i>	29	3	10.34	43	2	4.65	29	4	13.79
<i>A.ochraceus</i>	29	2	6.90	43	1	2.33	29	5	17.24
<i>A. parasiticus</i>	29	2	6.90	43	4	9.30	29	3	10.34
<i>A. terreus</i>	29	1	3.45	43	3	6.98	29	1	3.45
<i>A.versicolor</i>	29	4	13.79	43	2	4.65	29	2	6.90
<i>Penicillium spp.</i>	29	8	27.58	43	9	20.93	29	4	13.79
<i>Fusarium spp.</i>	29	12	41.37	43	11	25.58	29	12	41.34
<i>Rhizopus spp.</i>	29	11	37.93	43	10	23.25	29	13	44.83
<i>Mucor spp.</i>	29	9	31.03	43	15	34.88	29	8	27.58

Tablodan da görüleceği üzere yığınlardan alınan örneklerde en çok *Fusarium* türlerine (%41.37), torbalardan alınan örneklerde de *Mucor* türlerine (%34.88) ve yemliklerden alınan örneklerde ise *Rhizopus* türlerine (%44.83) olarak rastlanılmıştır.

Yem hammaddelerinden identifiye edilen küfler Tablo 13'de gösterilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi, yem hammaddelerinden mısırdan en çok rastalanan küf mantarı %75 lik bir oranla *Fusarium*, arpada %33.3 ile *Mucor* spp., buğdayda %33.33 ile *Fusarium* ve *Rhizopus* türleri, SFK'da %28,57 ile *A.fumigatus*, *Rhizopus* ve *Mucor* spp., balık ununda %33.33 ile *Fusarium* spp., PTK'da %16.66 ile *A.glaucus*, *A.ochraceus*, *Fusarium* spp, *Rhizopus* ve *Mucor* spp. ve et-kemik ununda ise %16.66 ile *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.versicolor*, *Fusarium* spp. *Mucor* spp. olmuştur.

Karma yemlerde identifiye edilen küfler Tablo 14 de gösterilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi, etlik civciv yeminde en çok %50.0 lik bir oranla *Rhizopus*, yumurta civciv yeminde %37.50 lik bir oranla *A.flavus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Mucor* spp., piliç büyütme yeminde ise %40 lik oranla *Rhizopus*, piliç geliştirme yeminde %50.0 lik bir oranla *Penicillium* spp., etlik piliç yeminde ise %57.14 lük bir oranla *Fusarium* spp., yumurta yemi I.dönemde %66.66 *A.flavus*, II.dönemde %57.14 lik bir oranla *A.flavus* ve *Mucor* spp'ye rastlanılmıştır.

Tablo 13: Yem hammadelerinde identifiye edilen küfler

Küfler	Msir		Arpa		Buğday		SFK		Balık unu		PTK		Et-Kemik Unu	
	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%
<i>A. candidus</i>	1	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. glaucus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	16.66	-	-
<i>A. flavus</i>	1	12.5	1	16.66	-	-	1	16.66	1	16.66	-	-	1	16.66
<i>A. fumigatus</i>	2	25.0	-	-	1	16.66	2	28.57	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	1	16.66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	16.66	-	-
<i>A. paraciticus</i>	1	12.5	-	-	-	-	1	14.28	-	-	-	-	-	-
<i>A. terreus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	16.66	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	16.66	-	-	1	16.66
<i>Penicillium spp.</i>	2	25.0	1	16.66	-	-	1	14.28	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium spp.</i>	6	75.0	3	50	2	33.33	1	14.28	2	33.33	1	16.66	1	16.66
<i>Rhizopus spp.</i>	4	50	1	16.66	2	33.33	2	28.57	1	16.66	1	16.66	-	-
<i>Mucor spp.</i>	4	50	2	33.33	1	16.66	2	28.57	-	-	1	16.66	-	-

Tablo 14: Karma yemlerde identifiye edilen küfler

Küfler	Etlik civciv yemi		Yalçıv yemi		P.beyt. yemi		P.Gelst. yemi		Etlik P. yemi		Y. Tavuğu yemi I		Y. Tavuğu yemi II	
	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%	Örnek s.	%
<i>A.candidus</i>	2	25.00	2	25.00	2	20.00	3	30.0	1	14.29	1	16.66	2	28.57
<i>A.glaucus</i>	3	37.50	1	12.50	2	20.00	1	10.0	1	14.29	2	33.33	2	28.57
<i>A. flavus</i>	2	25.0	3	37.50	3	30.0	2	20.0	2	23.57	4	66.66	4	57.14
<i>A.fumigatus</i>	-	-	-	-	3	30.0	2	20.0	-	-	2	33.33	2	28.57
<i>A.niger</i>	2	25.0	1	12.50	2	20.0	1	10.0	2	23.57	-	-	-	-
<i>A.ochraceus</i>	1	12.50	1	12.50	-	-	2	20.0	-	-	1	16.66	2	28.57
<i>A.parasiticus</i>	1	12.50	1	12.50	2	20.0	1	10.0	-	-	-	-	2	28.57
<i>A.terreus</i>	-	-	-	-	1	10.0	-	10.0	2	28.57	1	16.66	-	-
<i>A.versicolor</i>	-	-	-	-	1	10.0	2	20.0	1	14.29	1	16.66	1	14.29
<i>Penicillium spp.</i>	3	37.50	3	37.50	3	30.0	5	50.0	-	-	2	33.33	1	14.29
<i>Fusarium spp.</i>	3	37.50	2	25.0	3	30.0	3	30.0	4	57.14	2	33.33	2	28.57
<i>Rhizopus spp.</i>	4	50.0	3	37.50	4	40.0	3	30.0	2	28.57	2	33.33	3	42.86
<i>Mucor spp.</i>	2	25.0	3	37.50	3	30.0	4	40.0	3	42.86	3	33.33	4	57.14

3.4. Aflatoksin ve Okratoksin A Analizlerinin Sonuçları

3.4.1. Kullanılan Yöntemin Geri Alma Oranları

Geri alma çalışmasında aflatoksin ve Okratoksin A bulunmayan ve üç paralel (P) üzerinden incelenen karma yem örneklerine ilişkin, geri alma oranları aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 15, 16). Geri alma oranları aflatoksinler için ortalama (Ort.) %82.8, Okratoksin A için ise %84 olarak bulunmuştur.

Tablo 15: Aflatoksinlerin geri alma oranları,%

Katılan standart miktarı, ppb			Geri alınan miktar, ppb				Geri alma oranı			
1.P	2.P.	3.P	1.P	2.P	3.P	Ort.	1.P	2.P	3.P	Ort.
5	5	5	3.8	4.5	4.3	4.2	76	90	86	84
10	10	10	8.5	8.3	8.0	8.2	85	83	80	82
20	20	20	17.5	16.0	16.2	16.5	87.5	80	81	82.5
							Genel ortalama			82.8

Tablo 16: Okratoksin A'nın geri alma oranları,%

Katılan standart miktarı, ppb			Geri alınan miktar, ppb				Geri alma oranı			
1.P	2.P.	3.P	1.P	2.P	3.P	Ort.	1.P	2.P	3.P	Ort.
5	5	5	3.6	4.0	4.0	3.8	72	80	80	76
10	10	10	8.1	9.2	8.5	8.6	81	92	85	86
15	15	15	13.8	13.3	13.5	13.5	92	88.6	90	90
Genel ortalama										84

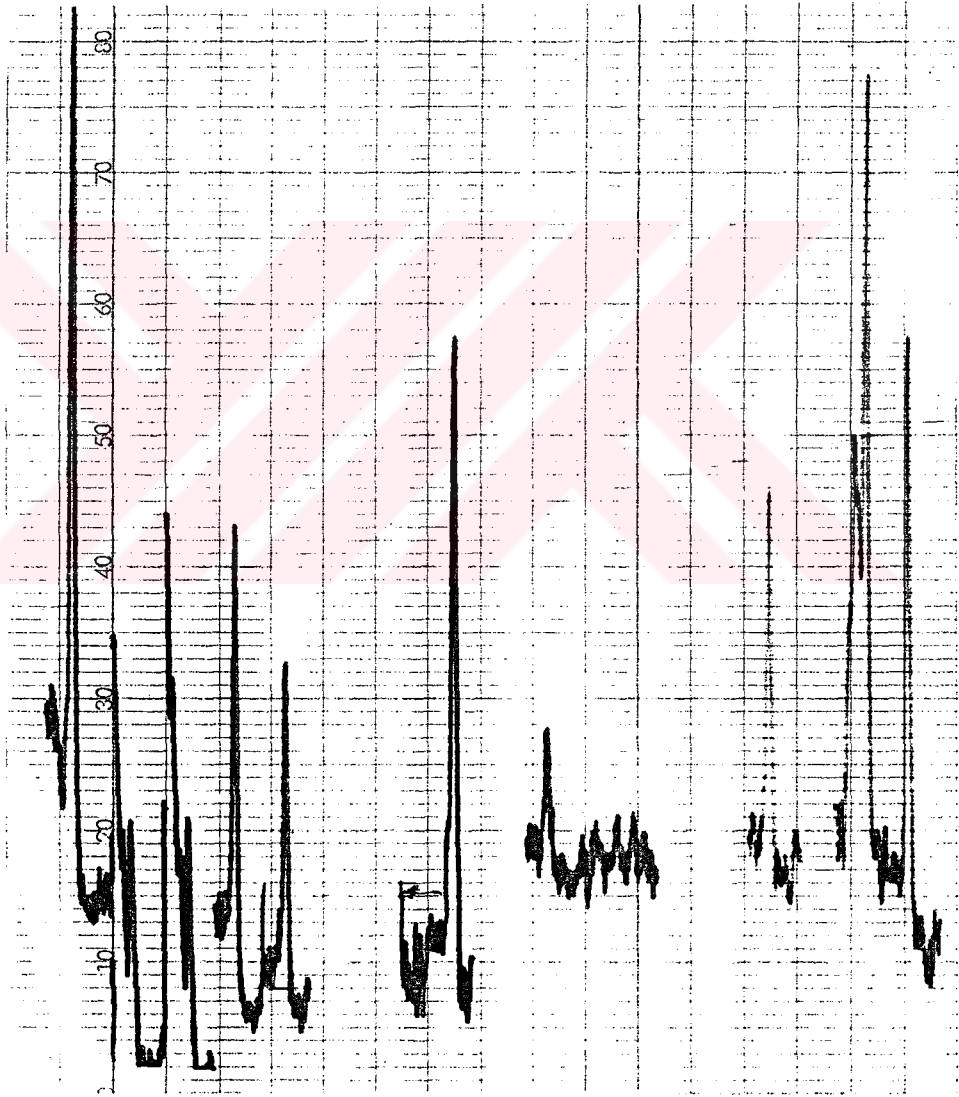
3.4.2. Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeyleri

Yem örneklerinde Aflatoksin ve Okratoksin A düzeyleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 17 : Yemlerdeki aflatoksin ve Okratoksin A kontaminasyonu

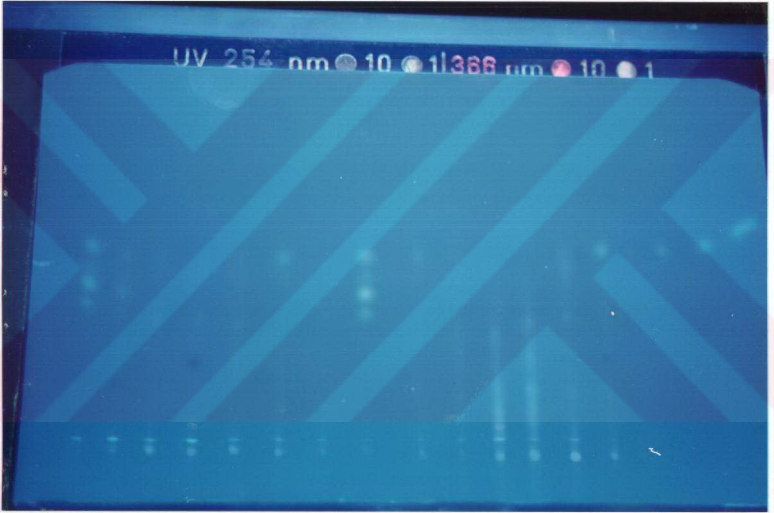
Toksin	Toplam örnek sayısı, n	Pozitif örnek sayısı	%	$\bar{x}$
Aflatoksin B ₁	101	22	21.78	5.314
Aflatoksin B ₂	101	2	1.98	iz
Aflatoksin G ₁	101	1	0.99	iz
Aflatoksin G ₂	101	-	-	-
Okratoksin A	101	6	5.94	1.9

Tabloda görüldüğü gibi, ortalama olarak 22 yem örneğinde ortalama 5.314 ppb Aflatoksin B₁ , 2 yemde iz miktarda Aflatoksin B₂ bir örnekte iz miktarda Aflatoksin G₁ , 6 örnekte de 1.9 ppb Okratoksin A bulunmuş, Aflatoksin G₂'e ise hiç bir örnekte rastlanılmamıştır. Aflatoksin ve okratoksin içeren bazı örneklerle ait kromatogramlar Şekil 8 de gösterilmiştir.



Şekil 8: Toksin içeren örneklerin ince tabaka kromatogramı

TLC plakalarına tatbik edilen ekstraktların UV lambasında görünümü aşağıdaki fotoğrafta görülmektedir



Resim 1: Ekstraktların UV lambada görünümü

Yığın, torba ve yemliklerden alınan yem örneklerine ilişkin Aflatoksin ve Okratoksin A değerleri Tablo 18'de sunulmuştur.

Tablo 18: Yığın, torba ve yemliklerden alınan örneklerde aflatoksin ve okratoksin kontaminasyonu

	Örnek sayısı, n	Yığın	Torba	Yemlik
İncelenen örnek	101	29	43	29
%		28.71	42.57	28.71
Aflatoksin pozitif sayı	22	3	9	10
%		13.63	40.90	45.45
Okratoksin pozitif	6	-	4	2
%		0	66.66	33.33

Yem tiplerine göre aflatoksin ve Okratoksin A kantaminasyonu Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 19 :Yem tiplerine göre Aflatoksin ve Okratoksin kontaminasyonu

Yemin tipi	Örnek Sayısı	% Aflatoksin pozitif	% Okratoksin pozitif		
i)Yem Hammaddeleri					
Mısır	8	7.92	2	25	-
Buğday	6	5.94	-	-	-
Arpa	6	5.94	-	-	-
SFK	7	6.93	-	-	-
Balık unu	6	5.94	-	-	-
PTK	6	5.94	-	-	-
Et kemik unu	6	5.94	-	-	-
ii) Karma yemler					
Etlik civciv yemi	8	7.92	1	12.5	2
Yumurta civciv yemi	8	7.92	1	12.5	-
Piliç büyütme yemi	10	9.90	4	40	1
Piliç geliştirme yemi	10	9.90	6	60	-
Etlik piliç yemi	7	6.93	4	57.14	-
Yumurta yemi I.dön.	6	5.94	1	16.66	3
Yumurta yemi II.dön.	7	6.93	3	42.85	-

Tabloda izleneceği üzere, etlik civciv yeminde 1 örnekte aflatoksin, 2 örnekte Okratoksin A, yumurta civciv yemlerinde 1 örnekte aflatoksin, piliç büyüme yemlerinde 4 örnekte aflatoksin, 1 örnekte Okratoksin A, piliç geliştirme yemlerinde 6 örnekte aflatoksin, etlik piliç yemlerinde 4 örnekte aflatoksin, yumurta I.dönem yemlerinde 1 örnekte aflatoksin ve 3 örnekte Okratoksin A, II.dönem yemlerinde 3 örnekte aflatoksin, mısır örneklerinde 2 örnekte aflatoksin bulunmuştur.

Yemlerde tespit edilen aflatoksin miktarları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 20: Yem örneklerinde aflatoksin ve Okratoksin A miktarları, ppb

Yem tipi	Örnek sayısı	Aflatoksin	Örnek sayısı	Okratoksin A
i)Yem Hammaddeleri				
Mısır	2	0.8,1	-	-
Arpa	-	-	-	-
SFK	-	-	-	-
Balık unu	-	-	-	-
PTK	-	-	-	-
Et-Kemik Unu	-	-	-	-
ii)Karma Yemler				
Etlik civciv yemi	1	11	2	1,1.1
Yumurta civciv yemi	1	1.2	-	-
Piliç büyüme yemi	4	4,8.3,12,14.5	1	0.6
Piliç geliştirme yemi	6	1.3,4.3,6,6,6.4,12	-	-
Etlik piliç yemi	4	0.5,2,2.5,9.6	-	-
Yumurta tavuğu I.dönem	1	2.2	3	0.6,0.8,7.3
Yumurta tavuğu II.dönem	3	0.6,1,8.3	-	-

Fabrika ve işletmelerden alınan yemlerin aflatoksin ve okratoksin bakımından kontaminasyonu aşağıdaki tabloda (Tablo 21) gösterilmiştir. Tablodan da izleneceği üzere, fabrika yemlerinin 6'sında (%9.83), işletme yemlerinin 16'sında (%40) Aflatoksin B₁, 2'sinde iz düzeyde (%5) Aflatoksin B₂, 1'inde iz düzeyinde (%2.5) Aflatoksin G₁, 6'sında ise (%15) Okratoksin A bulunmuştur.

Tablo 21 : Örnek alma yeri bakımından
aflatoksin ve Okratoksin A kontaminasyonu

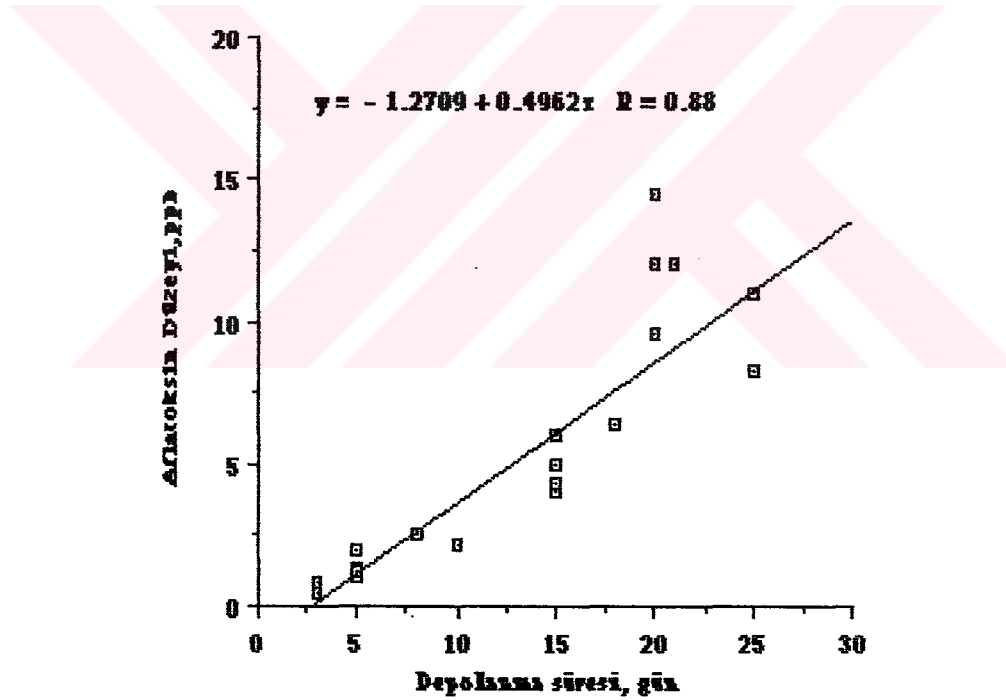
Toksin	<u>Fabrika yemi</u>			<u>İşletme yemi</u>			Toplam sayı n
	Örnek Sayısı	Pozitif	%	Örnek sayısı	Pozitif	%	
Aflatoksin B ₁	61	6	9.83	40	16	40	101
Aflatoksin B ₂	61	-	-	40	2	5	101
Aflatoksin G ₁	61	-	-	40	1	2.5	101
Aflatoksin G ₂	61	-	-	40	-	-	101
Okratoksin A	61	-	-	40	6	15	101

Depolanma süresi açısından yem örneklerindeki aflatoksin ve Okratoksin A düzeyleri Tablo 22'de gösterilmiştir. Tabloda görüleceği üzere, farklı günlerde depolanan yemler ile aflatoksin ve okratoksin düzeyleri arasındaki ilişki 7 günden az depolanan yemlerde aflatoksin miktarı 1.114 ppb, okratoksin A 0.60 ppb, 8-15 gün arasında depolanan yemlerde aflatoksin 4.285 ppb, okratoksin A 0.967 ppb, 16 günden fazla depolanan yemlerde aflatoksin miktarı 10.263 ppb, okratoksin A miktarı 7.3 ppb olarak bulunmuştur.

Tablo 22 : Depolanma sürelerine göre aflatoksin
ve Okratoksin A düzeyleri, ppb

Depolanma süresi,gün	Aflatoksin	Okratoksin A
<7	1.114	0.60
8-15	4.285	0.967
>16	10.263	7.3

Depolanma süresi ve aflatoksin düzeyi arasındaki bağıntı aşağıdaki şekilde görülmektedir.

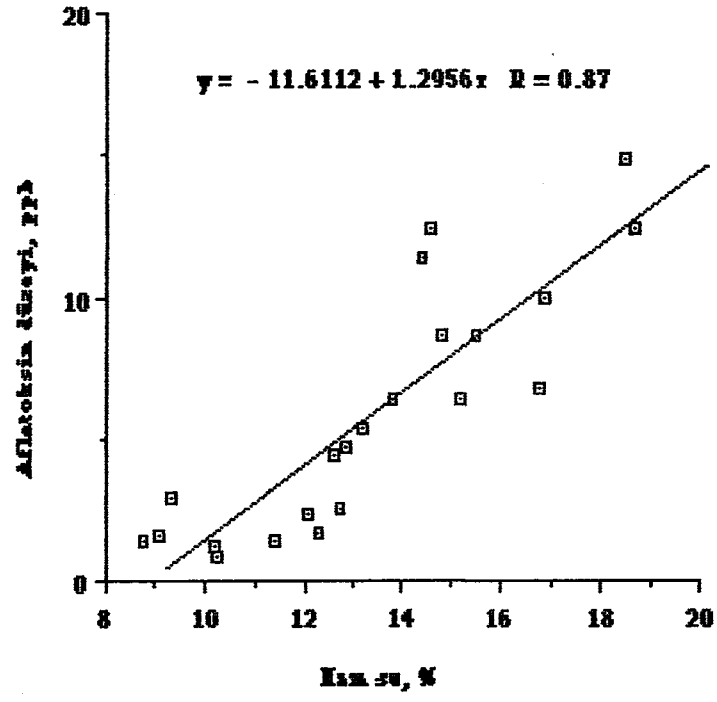


Şekil 9: Depolanma süresi ve aflatoksin düzeyi bağıntısı

Yemlerdeki ham su düzeylerine göre , aflatoksin ve Okratoksin A düzeyleri Tablo 23 ve Şekil 10' da verilmiştir. Ham su düzeyi % 9'dan düşük olan yemlerde aflatoksin ve Okratoksin A ya rastlanılmazken, %9-13 arasında olan yemlerde aflatoksin düzeyi 2.067 ppb, Okratoksin A düzeyi 0.820 ppb, %13'den yukarı olan yemlerde ise aflatoksin miktarı 9.01 ppb, Okratoksin A miktarı ise 7.3 ppb olarak bulunmuştur.

Tablo 23 : Yemlerdeki ham su düzeylerine göre
aflatoksin ve Okratoksin A düzeyleri, ppb

Ham su, %	Aflatoksin	Okratoksin A
<9	-	-
9-13	2.067	0.820
>13	9.01	7.30



Şekil 10: Ham su ve aflatoksin düzeyleri arasındaki bağıntı

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda kanatlılarda ciddi problemler oluşturan kûf mantarlarının salgıladığı toksinlerin, Elazığ bölgesi kanatlı ve yem hammaddeleri ve karma yemlerinde tespiti amacıyla yapılan bu çalışmada toplam 101 adet yem örneği kullanılmıştır.

4.1. Kûf Mantarı Sayıları ve İdentifikasyonu

Yem örneklerine ilişkin ham su düzeyi ortalama olarak, yem hammaddelerinde % 9.84, karma yemlerde ise % 12.71 bulunmuştur (Tablo 7). Yem hammaddeleri ve karma yem ham su düzeyleri arasında önemli farklılık göze çarpmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç, karma yemlerin yapısına giren yapı taşların, doğal bütünlükleri bozulduğu için, çevreden daha kolay su çekmelerine bağlanabilir. Tablodan da görüldüğü gibi, en yüksek ham su düzeyi % 12.08 lik oranla yem hammaddelerinden mısırdaki, % 13.59 luk oranla karma yemlerde etlik piliç yeminde bulunmuştur. Mısırdaki ham su düzeyinin diğer ham maddelere göre yüksek çıkması, mısırın ara ürün olarak elde edilmesi sonucu hasadın erken yapılması ve koçanların bir anda olgunlaşmasına bağlanabilir. Nitekim, benzeri bir yaklaşımla yapılan bir çalışmada da (70) mısırın ham su düzeyi %10.5-13.3 arasında bulunmuştur. Karma yemlerden etlik piliç yeminde ham suyun yüksek olması da bileşiminde bulunan sıvı yağ ve melastan ileri gelebilir.

Kûf mantarı sayıları açısından yem hammaddeleri ile karma yemler arasında bir karşılaştırma yapıldığında (Tablo 8), ortalama olarak sırasıyla, 1.0×10^4 ve 2.3×10^4 adet/g biçiminde olduğu görülmektedir. Bu da, karma yemlerin bütünlüğünün bozulması sonucu mikroorganizmaların yemlerdeki besin maddelerinden daha iyi yararlanılmasından veya söz

konusu yemlerdeki ham su düzeyi ve depolanma sürelerinin uygun olmayışından kaynaklanabilir. Nitekim, küf mantarı sayısı ile yemlerdeki ham su düzeyi arasında pozitif bir korrelasyon ($r= 0.79$) bulunmuştur (Şekil 6).

Küf mantarı sayılarına örnek alma yeri açısından yaklaşıldığında, fabrikadan alınan hammaddeler ile karma yemler ve işletme karma yemlerine ilişkin ortalama küf sayılarının sırasıyla, 1.0×10^4 , 2.3×10^4 ve 5.6×10^4 adet/g olduğu görülmektedir. Yem hammaddelerinin küf sayıları 0.1×10^4 (arpa) ile 7.0×10^4 adet/g (et-kemik unu) arasında, fabrikadan alınan karma yemlerdeki küf sayıları 1.2×10^4 (yumurta civciv yemi) ile 3.1×10^4 adet/g (etlik piliç yemi) arasında, işletmeden alınan karma yemlerdeki küf mantarı sayıları da 3.2×10^4 (yumurta civciv yemi) ile 9.5×10^4 adet/g (etlik piliç yemi) arasında değişmiştir (Tablo 8). Arpada küf mantarı sayısının düşük olması, arpanın mekanik zedelenmelere karşı diğer hammaddelere göre dayanıklı olmasına, karma yemlerden de etlik piliç yeminde yüksek düzeyde küf sayısının bulunması işletmelerdeki depolanma koşullarına bağlanabilir. Bu arada benzeri yaklaşımlarla yapılan bazı araştırmalarda (24,70), yem hammaddelerinde küf sayıları 0.9×10^4 ile 23×10^4 adet/g arasında tespit edilmiştir. Karma yemlerdeki küf mantarı sayıları da yumurta civciv yemleri için 2.46×10^4 adet/g, etlik civciv yemi için 0.79×10^4 adet/g, etlik piliç yemi için 0.04×10^4 adet/g, yumurta tavuğu yemi için de 2.6×10^4 adet/g olarak bulunmuştur. Bu sonuçların farklılığı bölgenin ikliminden, örneklerin alındığı mevsimden ve yemleme hijyeninden kaynaklanabilir. Yine, Jones (45), karma yemlerde yaptığı çalışmada, canlı ağırlık artışı, yemden yararlanma gibi faktörler açısından iyi, orta ve kötü performans gösteren piliçlerin yemlerinde ortalama küf sayısını, sırasıyla, 7.9×10^3 , 3.46×10^4 , 4.36×10^4 adet/g olarak tespit etmiştir. Araştırmacı, performansı düşük üretime sahip olan

piliçlerin yemlerinde çok sayıda küf tespit ederken, en az küf sayısını ise iyi performans gösteren piliçlerin yemlerinde elde etmiştir. Bu değerler, genelde, ortalama değerlerimiz ile uygunluk göstermektedir. Ancak, işletmelerden aldığımız yemlerdeki küf mantarı sayıları bu değerlerden daha yüksek çıkmıştır. Çünkü, tavuk yemlerinde genellikle hijyen, torbalar açıldıktan sonra işletmeye bağlı olarak bozulmaktadır. Bu da depolama şartları, sıcaklık, nisbi nem gibi çevresel faktörlere bağlanabilir. Çünkü, küflerin gelişmesi için ortalama sıcaklık 27°C ve nisbi nem de %60 dolayındadır.

Küf mantarı sayıları torba, yığın ve yemlik örneklerinde ortalama olarak sırasıyla, 1.5×10^4 adet/g, 3×10^4 adet/g ve 4.2×10^4 adet/g olarak bulunmuştur (Tablo 9). Yemliklerdeki küf sayısının yüksek olması, artan yemlerin çeşitli nedenlerle (suluk ile yakınlık, hayvanın ağızından kaynaklanan tükrük vs.) alınmaması, hayvan ekskrementlerinin yemlerle karışması, yemliklerin ıslanması gibi yemleme tekniklerine bağlı olarak ortaya çıkabilir.

Yemlerin depolanma süresi ile küf sayısı arasında sıkı bir bağıntı ($R=0.79$) bulunmuştur (Şekil 7). Bu bulgu, yemlerin depolanma sürelerinin artmasına paralel olarak küf sayısının arttığını bildiren pek çok araştırma sonuçları hatta klasik beklentiler ile uyum içerisindedir (20,37,45,64). Bu da, gıda maddelerinde olduğu gibi, yemlerin de saklanma yerleri ve sürelerin belirtilmesini bir bakıma zorunlu kılmaktadır.

Yem tiplerine göre (etlik, yumurtacı) mantar sayıları karşılaştırıldığında, küf sayılarının $1-5 \times 10^4$ arasında yoğunlaştığı, 10×10^4 den yüksek küf sayısına birkaç örnekte (etlik piliç yemi) rastlanıldığı görülmektedir (Tablo 10). Karma yemlerde bazı değerlerin ülkemiz için verilen sınır değerlerin (2) üstünde olması, küflerin toksin salgılayarak hayvanlarda meydana getireceği etkileri göz önüne alınırsa,

hiç de sevindirici değildir.

Küf mantarlarının identifikasyonunda, *Fusarium*lara % 34.65, *A. candidus* ve *A. parasiticusa* % 13.86, *A. glaucusa* % 12.87, *A. flavusa* % 24.75, *A. niger* ve *A. fumigatusa* % 8.9, *A. ochraceus* ve *A. versicolora* 7.92, *A. terreusa* % 4.95, *Penicillium*lara %20.79, *Rhizopus*lara % 33.66 ve *Mucor*lara da % 31.68 oranında rastlanılmıştır (Tablo 11). Görüldüğü gibi, yem örneklerinde *Aspergillus* türlerine çok rastlanılmıştır. Benzer bir yaklaşımla Hastiona (41), tarafından 30 piliç yemi üzerinde yapılan araştırmada, yemlerde *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.glaucus* ve diğer *Aspergillus* türlerinin oranları, sırasıyla, %8.39, 61.15, 5.28, 2.64, 0.96 ve 21.58 olarak tespit edilmiştir. Bu sonucun, bulgularımızla uyum içerisinde olduğu söylenebilir.

İdentifiye edilen küf mantarları yığın, torba ve yemliklerde en yüksek ve en düşük oranların sırasıyla, % 41.37 ile % 3.45, % 34.88 ile %2.33 ve % 44.83-3.45 şeklinde olmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek oran % 44.83 ile yemliklerde gerçekleşmiştir (Tablo 12). Bu bulgu beklentilere uygun düşmektedir. Aynı tablo incelendiğinde, *Aspergillus* cinsi içinde ilk sırayı yığın, torba ve yemliklerde, sırasıyla, % 24.14 oranında *A. flavus*, % 20.93 lük oranla *A. candidus* ve % 34.48 lük oranla *A. flavus* almıştır. En az rastlananları ise, sırasıyla, % 3.45 lik oranla *A. candidus*, *A. terreus*, % 2.33 lük oranla *A. ochraceus* ve % 3.45 lik oranla *A. terreus* olmuştur.

Refai ve ark. (69) tavuklarda hastalık ve ölümlere neden olan yemler üzerinde yaptıkları mikolojik çalışmada 30 yem ve 20 altlık örneği incelemişler ve en yaygın küf mantarı olarak piliç yemlerinde *A.fumigatus*'u tespit etmişler ve bu arada *A.niger* insidansının düşük olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan, ülkemizde yapılan bir çalışmada da (28), 140 yem örneğinde, predominant küflerin *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* ve *Eurotium*lar olarak tespit edilmiştir. Söz konusu

araştırma verileri (28,69) ile sonuçlarımız arasında paralellik göze çarpmaktadır.

Yem hammaddelerinde yapılan identifikasyon çalışmasında, Mısır örneklerinde 3, arpada 6, buğdayda 4, soya fasulyesi küspesinde 7, balık unu ve pamuk tohumu küspesinde 5, et-kemik ununda ise 3 ayrı küf mantarı türü tespit edilmiştir. En çok rastlanan küf mantarları yem hammaddelerinden mısır, arpa, balık unu ve buğdayda *Fusarium* ve *Rhizopus*, soya fasulyesi küspesinde *Rhizopus* ve *Mucor* türleri olmuştur (Tablo 13). *Fusarium*ların zearaleanon salgıladıkları, zearaleanonun da hayvanlar üzerine pek çok olumsuz etkisi göz önüne alındığında konunun önemi kendiliğinden ortaya çıkmaktadır (19,25,43,55).

Bu arada araştırmamızda olduğu gibi benzeri yaklaşımla yapılan çeşitli araştırmalarda da (24,63,69) mısırdaki *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Penicillium*, buğdayda *Penicillium*, arpada, *Aspergillus* ve *Penicillium*, soya fasulyesi küspesinde *Penicillium*, ve *Mucor*, pamuk tohumu küspesinde, *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri predominant olarak tespit edilmiştir.

Karma yemlerden etlik civciv yemlerinde *Rhizopus*, yumurta yemlerinde *A.Flavus*, *Penicillium* , *Rhizopus* ve *Mucor* , piliç büyütmeye yemlerinde *Rhizopus* , piliç geliştirme yemlerinde *Mucor* , etlik piliç yemlerinde *Fusarium* , yumurta tavuğu I. dönem yemlerinde *A. flavus* , yumurta tavuğu II. dönem yemlerinde de *A. flavus* ve *Mucor* türünden küflere yüksek oranda rastlanılmıştır (Tablo 14). Ancak, hammadde-yemlik zinciri içerisinde olayları izlemeden, bu tür mantarların özellikle söz konusu yemlerde mi ürediğini veya hammaddelerin işletmelerde mi bulaştığını kesin olarak söylemenin zor olduğu kanısındayım.

Kharchenko (53), küf türleri içinde *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.nidulans*, *A.niger*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Rhizopus* türlerini tespit etmiştir. Yine, aynı amaçla karma yemler üzerine yapılan çalışmalarda *Rhizopus*,

Aspergillus, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor* gibi küf mantarları tespit edilmiştir (12,24,37,70).

Sonuçlar (14,63) ve araştırmamızın bulguları kanatlı karma yemlerinde en sık rastlanan küf mantarı cinsinin *Aspergilluslar* olduğunu göstermiştir.

4.2. Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeyleri

Kullandığımız metodun geri alma oranları aflatoksinler için %82.8 (Tablo 15), okratoksinler için ise % 84 (Tablo 16) olarak tespit edilmiştir. Mikotoksin analiz metotlarındaki güvenilir geri alma oranı en az %70 olarak kabul edilmektedir (29). Bulgularımız bu açıdan ele alınırsa, sonuçların güvenilirlik oranı memnuniyet verici olduğu söylenebilir.

Aflatoksin ve okratoksin analizi yapılan 101 adet yem hammaddesi ve karma yemlerde tespit edilen Aflatoksin B₁ düzeyi ortalama olarak, 5.314 ppb, B₂ ve G₁ iz miktarda bulunmuş, G₂ ye rastlanmamıştır. Okratoksin A düzeyi ise ortalama olarak 1.9 ppb olarak bulunmuştur. Aflatoksinlerin bulunma oranları Aflatoksin B₁ için % 21.78 , Aflatoksin B₂ için % 1.98, Aflatoksin G₁ için % 0.99 ve Okratoksin A için % 5.94 olarak tespit edilmiştir (Tablo 17).

Benzer yaklaşımla yapılan bir çalışmada (14) iki yıllık bir sürede Aflatoksin B₁ nin oranı ilk yıl için 2-640 ppb, ikinci yıl için de 5-41 ppb arasında bulunmuştur. Aflatoksin açısından pozitif olan örneklerin oranı ise ilk yıl için %50, 2. yıl için % 78 olmuştur. Yine benzeri bir çalışmada, değişik çiftliklerden toplanan kanatlı yem örneğinin aflatoksin düzeyi

1-2000 ppb arasında değişmiş ve kapsadığı oran %30.7 olarak saptanmıştır (42).

Ülkemizde de Şanlı ve ark. (81) tarafından yapılan bir çalışmada, toksin analizi yapılan 34 yumurta tavuğu yeminden 24'ünde Aflatoksin B₁, 10 unda Aflatoksin B₂, 4 ünde Aflatoksin G₁, 26 piliç yeminden 17 sinde Aflatoksin B₁ 10 unda Aflatoksin B₂, 2 sinde Aflatoksin G₁, 36 yem hammaddesinden 21 inde Aflatoksin B₁, 9 unda Aflatoksin B₂, 12 sinde Aflatoksin G₁ e rastlanmıştır, hiç bir yemde ise Aflatoksin G₂ tespit edilememiştir.

Yığın, torba ve yemliklerden alınan örneklerde pozitif aflatoksin oranı sırasıyla, % 13.63, 40.90, 45.45 olarak göze çarpmaktadır. (Tablo 18). Görüldüğü gibi, en yüksek Aflatoksin yemliklerden alınan örneklerde belirlenmiştir.

Yem tiplerine göre, Aflatoksin ve Okratoksin A miktarları karşılaştırıldığında, yem hammaddelerinden yalnızca mısırdaki 2 örnekte Aflatoksin , karma yemlerde ise 20 örnekte aflatoksin, 6 örnekte de Okratoksin A'ya rastlanmıştır (Tablo 19). Aflatoksinlerin karma yemlerde çok oluşu, toksin oluşumunun çoğunlukla yem hammaddelerinin işlenmesinden sonra oluştuğunu çağrıştırmaktadır. Yapılan benzeri bir çalışmada, mısır örneklerinin %90.5 i aflatoksin yönünden pozitif olduğu ve 5000 ppb- 5 ppm gibi yüksek düzeyde Aflatoksin taşıdığı bildirilmektedir (30). Yine, Konya bölgesinden toplanan 122 yem ve yem hammaddesinde ince tabaka kromatografi yöntemiyle Aflatoksin B₁, ve Okratoksin A analizleri yapılmış, 16 örnekte (8-22 mg/kg) Aflatoksin B₁, 1 örnekte (8mg/kg) Okratoksin A tespit edilmiştir (87).

Aflatoksin düzeyleri ; yem hammaddelelerinden mısırdan 0.8 - 1 ppb, karma yemlerden etlik civciv yemlerinde 11, yumurta civciv yemlerinde 1.2 ppb, piliç büyüme yemlerinde, 4, 8.3, 12, 14.5 ppb, piliç geliştirme yemlerinde 1.3, 4.3, 6, 6, 6.4, 12 ppb, etlik piliç yemlerinde 0.5, 2, 2.5 ve 9.6 ppb, yumurta tavuğu I. dönem yemlerinde 2.2 ppb ve yumurta tavuğu II. dönem yemlerinde 0.6, 1, 8.3 ppb olarak tespit edilmiştir. Okratoksin A düzeyleri ise, etlik civciv yemlerinde 1, 1.1ppb , piliç büyüme yemlerinde 0.6 ppb, yumurta tavuğu I. dönem yemlerinde 0.6, 0.8, 7.3 ppb olarak bulunmuştur (Tablo 20). Benzeri yaklaşımla yapılan bir çalışmada, bulgularımızda olduğu gibi, soya fasülyesi küspesi ve buğdayda mikotoksin bulunmamıştır (56).

Özpınar ve ark. (65), marmara bölgesinde yaptıkları bir çalışmada mevcut 15 yem fabrikasından 56 adet kanatlı yemi ve 8 adet yem hammaddesi olmak üzere toplam 74 adet yem örneklerinde ince tabaka kromatografisi yöntemi uygulamış, bunların %43 ünde 0.2-30.4 ppb düzeyinde aflatosin B₁e rastlamışlardır. Araştırmacıların yaptıkları bir başka çalışmada (66), 156 adet yem hammaddesi içerisinde sadece pamuk tohumu küspesi ve yer fıstığı küspesinde, 141 adet karma yemden de sadece alabalık yeminde 20 ppb nin üzerinde Aflatoksin B₁ tespit etmişlerdir. Bu bulgular çalışmamızla büyük bir paralellik göstermektedir.

Özpınar ve ark. (65) çalışmalarında, Okratoksin A'ya rastlamamışlardır. Bir başka araştırmalarında ise (66), enzimimmünolojik yöntemle analizi yapılan 156 adet yem hammaddesi içinde bir fındık küspesi ve iki yer fıstığı küspesinde, karma yemlerden de iki yumurta tavuğu, iki süt ve üç besi sığırı yemlerinde Okratoksin A tespit ettiklerini, fakat hiçbirinde 10 ppb nin üzerinde Okratoksin A'ya rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmamızda 14.5 ppb in üzerinde aflatoksine, 7.3 ppb in

üzerinde de Okratoksine rastlanılmamıştır. Böylece, bulgularımızın bu çalışma ile uyum içerisinde olduğu söylenebilir. Yapılan başka bir çalışmada, Acet ve ark (1), ince tabaka kromatografi yöntemi kullanarak 100 örnekten 10'unda mikotoksin bulmuşlardır. Bunlardan 2 örnekte Aflatoksin B₁, 5 örnekte Okratoksin A şeklindedir. Bulunan ortalama mikotoksin değerleri ise, Aflatoksin B₁, 375 ppm, OkratoksinA 12 ppm dir. Okratoksin sonuçları çalışmamızla paralellik gösterirken, aflatoksin sonuçları bulgularımıza göre çok yüksektir. Bu da çevre yemlerinin depolanma süreleri ve ham su düzeyi gibi faktörlere bağlanabilir. Böylece araştırmamız bulguları ile bölgeler arası o denli önemli bir farkın olmadığı görülmektedir. Bundan yola çıkarak, yemlerin mikotoksin düzeyi üretim ve kullanım bilincine bağlı olarak değiştiği söylenebilir.

Aflatoksin ve okratoksin kontaminasyonuna yemlerin kökeni açısından yaklaşıldığında, Aflatoksinler, 6 fabrika ve 16 işletme yeminde, okratoksinler ise işletme yemlerinde bulunmuştur (Tablo 21). Bu da asıl bulaşmanın işletmelerde olduğunu göstermektedir. Nitekim, benzer yaklaşımla yapılan bir çalışmada (11), işletme yemlerinin %67.39'unda, fabrika yemlerinin ise %9'unda aflatoksin bulunmuştur.

Yemler üzerine en etkili faktörlerden sayılan depolanma süresi açısından konuya yaklaşıldığında, (Tablo 22). depolanma süresinin 16 günün üzerine çıkmasıyla hem aflatoksin, hem de Okratoksin A miktarı belirgin bir biçimde artmıştır. Buna karşılık, 7 güne kadar olan depolanma süresinde, aflatoksin ve okratoksin düzeyleri sırasıyla, 1.114 ve 0.60 , 8-15 gün arasında depolanan yemlerde 4.285 ve 0.967 ppb ve 16 günden fazla depolanan yemlerde ise, 10.263 ve 7.3 ppb olarak bulunmuştur. Sonuçlar klasik beklentilerle uyum içerisinde. Bu arada, daha önce yapılmış benzeri bir çalışmada (45); 6-10 gün arasında depolanan

yemlerde 8.0 ppb, 11-15 gün arasında depolanan yemlerde 10.7 ppb, 16-20 gün arasında ise 27.9 ppb olarak belirlemiştir. Aynı günlerde, sırasıyla, aflatoksin kontaminasyonunun düzeyi ise, sırasıyla, %23.4, 30 ve 66.7 olduğu görülmektedir.

Yemlerdeki ham su içeriğine göre aflatoksin ve okratoksin düzeyleri %9-13 arasında , 2.067 ve 0.820 ppb, % 13 den fazla olanlarda 9.01 ve 7.30 ppb olarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi, ham su düzeyinin artmasına paralel olarak aflatoksin ve okratoksin miktarları artmıştır (Tablo 23). Bu da beklentilere uygun düşmektedir. Şekil 10'da da görüleceği gibi, aflatoksin miktarı ile ham su düzeyi arasındaki bağıntı ($R=0.87$) önemli bulunmuştur.

Çeşitli ülkelerin aflatoksin için koydukları limitler de önemli farklılıklar göstermektedir. Örneğin Belçika'da karma yemler için sınır 40 ppb iken, Kanada'da yemler için 100 ppb, Fransa'da yemler ve yem hammaddeleri için 20-50 ppb, Rusya'da tahıllar ve diğer ürünler için 2,5 ppb, Almanya'da kanatlı yemleri için 10 ppb olarak belirlenmiştir. Bu limitlere göre, çalışmamızın bulguları şöyle sınıflandırılabilir: Aflatoksin içeren ve miktarı hesaplanan 22 adet örneğin 4 adedi (3'ü piliç yemi, 1'i civciv yemi), Almanya'nın 13 adedi (2 yumurta yemi, 10 piliç yemi, 1 civciv yemi), Rusya'nın belirlediği limitler üzerinde bulunurken, hiç bir örnekte, Belçika, Kanada ve Fransa'nın belirlediği sınırların üzerinde Aflatoksin miktarına rastlanılmamıştır (64).

Ülkemizde ise, Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ den oluşan toplam aflatoksin düzeyleri karma yemler için 50 ppb, tarım ürünleri ve gıda maddeleri için 20 ppb dir (3). Çalışmamızda en yüksek değer 14.5 ppb olduğundan, örneklerde ciddi boyutlarda aflatoksin olmadığını söyleyebiliriz.

Yem örneklerinde bulunan 7.3 ppb lik okratoksin A düzeyi, ülkeler için belirlenen sınır değerleri altında yer almıştır. Sonuçların bu şekilde çıkması sevindirici ve olumlu bulunmuştur.

S o n u ç : Bulgularımızdan da anlaşılacağı gibi küf kontaminasyonu ve mikotoksin salgılanması büyük ölçüde işletmelerde depolanma koşullarının uygun olmayışından kaynaklanmaktadır. Bu tür çalışmaların depolanma koşulları göz önüne alınarak, deneysel çalışmalarla standardize edilmesi, diğer bir deyişle her yemin kullanma ve saklama süresinin belirlenmesi yoluna gidilmesinin yararlı olacağı kanısındayız.



5. Ö Z E T

Bu araştırma, Elazığ bölgesi fabrika ve işletmelerinden alınan kanatlı yem hammaddeleri ve karma yemlerindeki küf mantarı sayıları ile aflatoksin ve Okratoksin A düzeylerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Yem hammaddeleri ve karma yemlerin ham su düzeyleri arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Alınış yerlerine göre küf mantarı sayıları, yem hammaddelerinden en çok mısırdaki (2.3×10^4), fabrika karma yemlerinden de etlik piliç yeminde (9.5×10^4) bulunmuştur. Küf mantarı sayıları ortalama olarak yem hammaddeleri için 1.0×10^4 adet/g, fabrikadan alınan karma yemler için 2.3×10^4 adet/g ve işletmelerden alınan karma yemleri için 5.6×10^4 adet/g olarak tespit edilmiştir.

İzole edilen küf mantarları *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* ve *Mucor* türleridir. Yem hammaddelerinden mısırdaki predominant küf mantarı %75'lik oranla *Fusarium*, arpada %33.33 ile *Mucor*, buğdayda %33.33 ile *Fusarium* ve *Rhizopus* türleri, soya fasulyesi küspesinde %28.57 ile *A.fumigatus*, *Rhizopus* ve *Mucor*, balık ununda %33.33 ile *Fusarium*, pamuk tohumu küspesinde de %16.66 ile *A.glaucus*, *A.ochraceus*, *Fusarium*, *Rhizopus* ve *Mucor*, et-kemik ununda ise %16.66 ile *A.flavus*, *A.paraciticus*, *A.versicolor*, *Fusarium* ve *Mucor* türleri tespit edilmiştir. Karma yemlerden de ise etlik civciv yeminde en çok %50.0 ile *Rhizopus*, yumurta civciv yeminde %37.50'lik bir oranla *Penicillium* ve *Mucor*, piliç büyüme yeminde %40'lık oranla *Rhizopus*, piliç geliştirme yeminde %50 ile *Penicillium*, etlik piliç yeminde %57.14 ile *Fusarium*, yumurta yemi I.döneminde %66.66 ile *A.flavus*, II.dönemde %57.14'lik bir oranla *Mucor* türlerine rastlanılmıştır.

Yem örneklerinde ince tabaka kromatografi yöntemi ile Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ile Okratoksin A analizi yapılmıştır. Aflatoksin B₁, 22 yem örneğinde (% 21.78) ortalama 5.314 ppb düzeyinde, Aflatoksin B₂, 2 örnekte (% 1.98) ve Aflatoksin G₁ 1 örnekte (% 0.99) iz düzeyde tespit edilirken, Aflatoksin G₂ ye rastlanılmamıştır. Öte yandan, Okratoksin A, 6 yem örneğinde (% 5.94) ortalama 1.9 ppb düzeyinde bulunmuştur.

Depolama süresi ile Aflatoksin ve Okratoksin A düzeyleri arasında olduğu gibi ham su düzeyi ile toksin düzeyleri arasında da yakın bir bağıntı tespit edilmiştir.



6. SUMMARY

This study was carried out to obtain numbers of mould, levels of aflatoxins and Ochratoxin A of 101 samples in mixed poultry feed and feed ingredients. Samples were collected from grower and feed production places. The difference between the moisture level of feed ingredients and mixed feed were significant ($P < 0.05$). The average mould counts were the highest in corn (2.3×10^4 number/g), in chicken feed (3.1×10^4) taken from feed production places and in chicken feed collected from farms. The average mould counts in feed ingredients and mixed poultry feeds taken from feed production places and farms were 1.0×10^4 , 2.3×10^4 and 5.6×10^4 number/g, respectively.

Species of mould identified were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* and *Mucor*. The predominant species of mould found in feed ingredients were *Fusarium* in corn, *Mucor* in barley, *Fusarium* and *Rhizopus* in wheat, *A.fumigatus*, *Rhizopus* and *Mucor* in soybean meals, *Fusarium* in fish flour, *A.glaucus*, *A.ochraceus*, *Fusarium*, *Rhizopus* ve *Mucor* in cotton seed meals, *A.flavus*, *A.paraciticus*, *A.versicolor*, *Fusarium* and *Mucor* in meat- bone flour. Whereas, the predominant mould of broiler starter feed, laying starter feed, broiler growth feed, broiler finishing feed, chicken feed, laying feed (first period)and laying feed (second period) were *Rhizopus* (50%), *Penicillium* and *Mucor* (37.50 %), *Rhizopus* (40 %), *Penicillium* (50 %), *Fusarium* (57.14%), *A.Flavus* (6.66 %) and (57.14 %), respectively.

A total of 101 samples of poultry feed were analyzed for the mycotoxins Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and Ochratoxin A using thin layer chromatography . Aflatoxin B₁ was detected in 22 (21.78 %) of the 101

feed samples at an average level of 5.314 ppb. Aflatoxin B₂ was found in two samples (1.98 %) at the trace level and Aflatoxin G₁ was detected in one sample (0.99 %) at the trace amount but, Aflatoxin G₂ was not determined. Ochratoxin A concentration in feed analyzed was 1.9 ppb.(5.94%).

There were significant relations between Aflatoxin and Ochratoxin A contamination of feeds and their duration of storage. Likewise, there were significant relations between the levels of moisture and aflatoxin and ochratoxin .



7. KAYNAKLAR

- 1- Acet,H.A., Demet.Ö. ve Traş,B. (1989). Yem ve Yem Maddelerinde Aflatoksin, Okratoksin A ve Zearalenon Kalıntılarının Kromatografik Yöntem ile Araştırılması. Selçuk Ün. Vet.Fak. Derg. 5 (1), 125-133.
- 2- Anon. (1980): Yem Hammaddeleri ve Karma Yemlerde Bulunan Bakteri ve Mantarların Seyretlme Metodu ile Kültürel Sayımları. 6 Ağustos 1980 tarih ve 17070 sayılı Resmi Gazete.
- 3-Anon, (1990). Tarım Orman ve Köyşleri Bakanlığının Aflatoksin Kalıntılarına Dair Tebliği (KKGM, 90/1), 2.5.1990 tarih ve 20506 sayılı Resmi Gazete.
- 4- A.O.A.C. (1990): Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Fifteenth Edition, Virginia, USA.
- 5-Archibald,R.M., Smith, H.j. and Smith, J.D.S (1962). Brazilian Groundnut Toxicosis in Canadian Broiler Chickens. Can.Vet.J. 3:322-325.
- 6- Arda, M. (1980). Mikoloji. A.Ü.Vet.Fak.Yayınları: 366, Ders Kitabı 264.
- 7-Arda, M. (1983): Yemlerin Mikrobiyolojik Analizlerine Ait Genel Metotlar. Kanatlı Hayvanların Enfeksiyon Hastalıkları ve Laboratuvar Teşhis Yöntemleri, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Yayınları, No:7.
- 8-Aydın, N. (1990). Hayvanların Önemli Mikotik Enfeksiyonları ve Mikotoksikozisler. Tavukçuluk Bülteni Sayı: 46, "Pfizer" Ulusal Tavukçuluk Sempozyumu'89.
- 9- Babila, A. ve Akçadağ, B. (1991). Kanatlılarda Görülen mikotoksikosis Olaylarında Yem ve Yem Maddelerinin Total Mantar Sayımı ile Toxin Analizleri. Pendik Hayv.Hst.Merk.Arşt. Enst.Derg. 22 (1-2), 63-83.

- 10- Bacha, H., Hadidane, R., Creppy, E.E., Regnault, C., Ellouze, F. and Dirheimer, G. (1988). Monitoring and Identification of Fungal Toxins in Food Products, Animal Feed and Cereals in Tunisia. *J.Stored Prod.Res.* 24 (4), 199-206.
- 11- Balaraman, N. ve Gupta, H.K. (1990). Occurrence of Aflatoxin in the Livestock Feeds of Sikkim. *Indian J.of.Anim. Nutrition* 7 (2):142-146.
- 12-Bharadwaj, V.B. and Khare, S.C. (1987). Aflatoxin in Feed and its Effect on Production in Chicken. *VET* 1 (3) 115-117.
- 13- Blaha, J. and Lohnisky, J. (1983). The Problem of The Occurrence of Fungi and Mycotoxins in Feed Mixtures for Poultry. *Veterinarstui*, 33 (2), 76-77.
- 14-Blaha, J., Tamchynova, J. and Reisnerova, H. (1990). The Occurrence of Moulds and Aflatoxin B₁ in Vietnamese Feeds. *Tropical Science* 30 (1), 21-31.
- 15- Brake, J., Hagler, W.M.Jr. and Jones, F.T. (1990). Effect Feeding Containing Corn Treated With a Commercial Mold Inhibitor (Myco-Curb) on Broiler-Breeder Performance. *Poultry Sci.* 69: 37-44.
- 16- Brown, J.M.M. and Abrahams, L. (1965). Biochemical Studies on Aflatoxicosis. Onderstepoort, *J.Vet.Res.* 32:119-146.
- 17-Carnoghan, R.B.A., Lewis, G., Patterson, D.S.P. and Allcroft, R. (1968). Biochemical and Pathological Aspects of Groundnut Poisoning in Chickens. *Path. Vet.* 3: 601-615.
- 18-Chang, C.F. and Hamilton, P.B. (1982). Increased Severity and New Symptoms of Infectious Bursal Disease During Aflatoxicosis in Broiler Chickens. *Poultry Sci.* 61:1061-1068.

- 19- Chamkasem, N., Cobb, W.Y., Latimer, G.W., Salinas, C. and Clement, B.A. (1989). Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Grains, Oilseeds and Animal Feeds by Post-Column Derivatization and On-Line Sample Cleans-up J.Assoc. off. Anal.Chem, 72 (2), 336-341.
- 20- Christensen, C.M. (1978). Storage Fungi In Food and Beverage Mycology. (Ed). L.R.Beuchat, AVI Publishing Comp. Inc.P. 173-190.
- 21- Council For Agricultural Science and Technology Report No:80 (1979). Aflatoxin and Other Mycotoxins: An Agricultural Perspective.
- 22- Çetin, İ. (1990). Avian Aflatoxicosis. Etlik Vet.Mikrobiyoloji Derg. 7(1), 161-180.
- 23- De Longh, H.R.O., and Pelt, J.G.V. (1964). Milk of Mamamals Fed an Aflatoxin-Containing Diet. Nature, 202: 466-467.
- 24- Demirer, M.A., Akkılıç, M., Özalp, E., Kaymaz, Ş., Dincer, B. ve Akşehirli, E. (1979). Piyasada Satılmakta Olan Bazı Karma Yemlerde ve Yem Hammaddelerinde Aflatoksin B₁ Araştırmaları. A.Ü.Vet.Fak.Derg., 26 (1-2), 169-184.
- 25- Diekman, M.A. and Green, M.L. (1992). Mycotoxins and Reproduction in Domestic Livestock. J.Anim.Sci. 70:1615-1627.
- 26- Edds, G.T., Nair, K.P.C. and Simpson, C.F. (1973). Effect of Aflatoxin B₁ on Resistance in Poultry Against Cecal Coccidiosis and Marek's Disease. Am.J.Vet.Res. 34: 819-826.
- 27- Egmond, H.P. and Poulsch, W.E. (1986). Determination of Mycotoxins. IUPAC, Pure and Appl. Chem. 58 (2): 315-326.
- 28- Eke, D., ve Alperden, İ (1986). Marmara Bölgesinde Üretilen Kanatlı Yemlerinde ve Yem Hammaddelerinde Mikoflora "Yem Sanayii Dergisi", 53, 24-31.

- 29- F.A.O. (1990). Mannuals of Food Guality Control 10 Training in Mycotoxins Analysis: Food and Agricultural Organisation of The United Nations, Rome.
- 30-Feng, Y.C. and Tang, J.R. (1990). Suruey of Aflatoxin Contamination of Feeds in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. Chinese Journal of Veterinary Medicine 16 (6) 16-18.
- 31- Fritz, Z., Jarosz, L., Schleicher, A., Szoltysek, K. and Jamroz, D. (1989). Use of *Aspergillus Niger* Mycelium and Fractionated Lucerne Meal in Mixed Feeds for Broilers. Roczniki Naukowe Zootechniki, Monografie, Rozprawy, 27, 337-348.
- 32-Gardiner, E.E. (1962). A Comparison of the Toxicity to Poulds and Chicks of a Certain Peanut Oil Meal. Poultry Sci. 4: 1348-1350.
- 33-Gibson, R.M. and Bailey, C.A. (1990): Impact of L-Phenylalanine Supplementation on the Performance of Three Week-Old Broilers Feed Diets Containing Ochratoxin A. I.Effects on Body Weight, Feed Conversion, Relative Organ Weight and Mortality. Poultry Sci. 69: 414-419.
- 34-Ghosh, J.D., Singh, J., Mahipal, S.K. and Kulshreshtha, R.C. (1990): Effect of Aflatoxin-Contaminated Feeds on Egg Production and Broiler Growth. Indian Journal of Animal Sci. 60 (6): 725-727.
- 35- Gorst-Allman, C.P. and Steyn, P.S (1979). Screening Methods for the Detection of Thirteen Common Mycotoxins. Jour. of Chromatography, 175, 325-331.
- 36- Gürel, A. (1986-87). Marmara Bölgesinde Civciv, Piliç ve Tavuklarda Görülen *Aspergillo*sis Vak'aları ve Mikotoksikozislerin Histopatolojik Muayenelerle Erken Tespiti. Pendik Hyv.Hst.Merk. Arş.Enst. (18), 1-2.

- 37- Hamilton, P.B. and Harris, J.R. (1971). Interaction of Aflatoxicosis With *Candida Albicans* Infections and Other Stresses in Chickens. *Poultry Sci.* 50:906-912.
- 38- Hamilton, P.B. and Garlich, J.D. (1971). Aflatoxins as A Possible Cause of Fatty Liver Syndrome. *Poultry Sci.* 50: 800-804.
- 39-Hamilton, P.B. (1984). Mycotoxicosis in Broiler Chickens. *Zootec.Int.Sept.* 46-52.
- 40- Hamilton, P.B., Pektaş, N. (1986). Mikotoksinler ve Kanatlılar. *Yem Sanayii Dergisi*, 52, 22-24.
- 41-Hastiono, S. (1986). Report on Biodeterioration of Chicken Rations by Mould in Indonesia. *LAB International*, 280-283.
- 42-Hegazy, S.M., Azzam, A. and Gabal, M.A. (1991). Interaction of Naturally Occurring Aflatoxins in Poultry Feed and Immunization Against Fowl Cholera. *Poultry Sci.* 70: 12, 2425-2428.
- 43-Howell, M.V. and Taylor, P.W. (1981). Determination of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Mixed Feeds, With Detection by Thin Layer Chromatography or High Performance Liquid Chromatography. *J.Assoc. of. Anal.Chem.* 64: 6, 1356-1363.
- 44- Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Corrier, D.E. and Mollenhaver, H.H. (1986). Progression of Aflatoxicosis in Broiler Chickens. *Poultry Sci.* 65: 1891-1899.
- 45- Jones, F.T., Hagler, W.H. and Hamilton, P.B. (1982). Association of Low Levels of Aflatoxin in Feed With Productivity Losses in Commercial Broiler Operations. *Poultry Sci.* 61: 861-868.
- 46- Jones, F.T., Hagler, W.M. and Hamilton, P.B. (1984). Correlation of Aflatoxin Contamination With Zinc Content of Chicken Feed. *Applied Environmental Microbiology*, 47: 478-480.

- 47-Jungerman, P.F. and Schwartzman, R.M. (1972): Veterinary Medical Mycology Philadelphia, p: 75-86.
- 48- Kaya, S. (1984). Mikotoksinler, Hayvan ve İnsan Sağlığı Yönünden Önemi. A.Ü.Vet.Fak. Derg., 31 (3):388-409.
- 49- Kaya, S. ve Bilgili, A. (1989). Yumurtalarda Aflatoksin kalıntıları. A.Ü.Vet.Fak.Derg., 36(3), 641-645.
- 50- Kaya,S. ve Bilgili, A. (1991). Etlik Piliç Yetiştiriciliğinde Altlıktan Kaynaklanabilecek Mikotoksin Riskinin Araştırılması. Doğa, T. J. of. Veterinary and Animal Sci. 15: 118-128.
- 51- Kelley, V.C. and Mora, E.C. (1976). Ultra Structural Changes Induced by Chronic Aflatoxicosis in Chickens. Poultry Sci. 55: 317-324.
- 52- Keskin, G. ve Uğur, A. (1991). kanatlı Yem ve Yem Hammaddelerinde Mantar İzolasyonu, İdentifikasyonu ile Mantar Sayısı ve Mikotoksin Araştırması. Pendik Hyv.Hast.Merk.Arş.Enst.Derg. 1-2:138-147.
- 53-Kharchenko, S.N. (1986). Antimicrobial Activity of Mycotoxins. Mikrobiologicheskii Zhurnal, 48 (1),71-76.
- 54- Krause, H.P. (1985): Untercuchung Zum Vorkommen der Mykotoxine Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ und Zearalenon im Schweinefutter (Fertigfuttermittel und betriebseigene Mischungen) im Raum Süd Schleswig-Holstein. Doktros der Veterinaermedizin an der Freien Universitaet, Berlin, 1-101.
- 55-Langseth, W., Ellingsen, Y., Nymoen, U. and Okland, E.M. (1989). High-Performance liquid Chromatographic Determination of Zearalenone and Ochratoxin A in Cereals and Feed. Journal of Chromatography, 478, 269-274.

- 56- Lim, S.K., Ching, A.L., Baygeo, T.K. and Lock-Lee, S.L. (1991). Aflatoxin Levels in Raw Commodities. Singapore Journal of Primary Industries., 19 (1), 59-63.
- 57- Mabbe, M.S. and Chipley, J.R. (1973). Tissue Distribution and Metabolism of Aflatoxin B₁-C¹⁴ in Broiler Chickens App. Microbiology, 25 (5), 763-769.
- 58- Majerus, P. and Zakaria, Z. (1992). A Rapid, Sensitive and Economic Method for the Detection, Quantification and Confirmation of Aflatoxins. Z.Lebensm Unters. Forsch 195: 316-319.
- 59- Mangat, A.P.S., Gill, B.S., Singh, P., Pushpindenpal-Singh (1987). Aspergillus Flavus and Aflatoxins in Poultry Feed and Its Correlation With Various Disease Problems in Poultry Farms. Indian Journal of Comparative-Microbiology, Immunology and Infectious Disease., 8 (3), 118-124.
- 60-Manning, R.D. and Wyatt, R.D. (1990). Effect of Cold Acclimation on the Broiler Chicks Resistance to Acute Aflatoxicosis. Poultry Sci. 69: 388-396.
- 61- Meyer, H., Bronsch, K. und Leibetseder, J. (1983). Suplemente zu Vorlesungen und Ubungen in der Tierernaehrung, Verlag Sprungmann, Hannover, 1+244.
- 62- Micco, C., Miraglia, M., Onori, R., Loppola, A. and Mantovani, A. (1987). Long-Term Administration of Low Doses of Mycotoxins in Poultry. 1. Residues of Ochratoxin A in Broilers and Laying Hens. Poultry Sci. 66:47-50.
- 63- Moreno Romo, M.A. and Suares F.G. (1986). Aflatoxin-Producing Potential of Aspergillus Flavus Strains Isolated From Spanish Poultry Feeds. Mycopathologia, 95 (3), 129-132.

- 64-**Özkaya Şennur (1990): Mısırdaki Zearalenon Üzerine Araştırmalar. (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Univ. Müh.Fak.Gıda Müh.Böl., 1+62.
- 65-** Özpınar, H., Özpınar, A. ve Şenel, H.S. (1989). Marmara Bölgesi Yem Fabrikalarından Alınan Kanatlı Karma Yemleri ve Yem Hammaddelerinin Aflatoksin ve Okratoksin A Yönünden İncelenmesi. Pendik Hyv.Hast.Mrk.Arş.Enst.Derg. 20 (1), 67-77.
- 66-** Özpınar, H., Kahraman, R., Şenel, H.S., Dietrich, R. ve Terplan, G. (1993). Yem Hammaddeleri ve Fabrika Yemlerinde Aflatoksin B₁ Okratoksin A ve Zearalenon Miktarının Enzimimmunolojik Yöntemle Saptanması. Doğa, Tr. J. of Veterinary and Animal Sci. (17): 239-244.
- 67-** Pier, A.C., D.V.M., Ph.D. (1976). Biological Effects and Diagnostic Problems of Mycotoxicoses in Poultry. In Proceeding of 25 th Western Poultry Disease Conference and 10 th Poultry Health Symposium. March 8-11, Orchines. California, USA.
- 68-** Platonow, N. (1965). Investigation of The Possibility of Presence of Aflatoxin in Meal and Liver of Chickens Fed Toxic Groundnut Meal. Vet.Rec. 77:1028.
- 69-** Refai, M., Hamad, H.A., Saleh, N.A., Abdel-Aziz, A.M., El-Shater, S.A., Azzam, A.H. and Edris, G.O. (1990). Mycotic Infectious in Birds and Rabbits and Their Control. Veterinary Medical Journal 38 (1): 129-143.
- 70-** Russel, L., Cox,D.F., Larsen, G., Bodwell,K. and Nelson, L.E. (1990). Incidence of Molds and Mycotoxins in Commercial Animal Feed Mills in Seven Midwestern States. J.Animal Sci. 69:5-12.

- 71-Sarı, M. ve Çerçi, İ.H. (1993): Yemler, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları (Ders Kitabı), Elazığ, S:254-257.
- 72- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Oorschot, C.A.N.V (1984). Introduction to Food Borne Fungi Centra Albureau Voor Schimmel Cultures Netherlands, 242 p.
- 73- Sawhney, D.S., Vadehra, D.V. and Baker, R.C. (1972). The Metabolism and Toxicology of C¹⁴ Aflatoxins in Laying Hens. Poultry Sci. 51 (5):240-245.
- 74- Sawhney, D.S., Vadehra, D.V. and Backer, R.C. (1973). Aflatoxicosis in the Laying Japanese Guail. Poultry Sci. 52:465..
- 75-Schaeffer, J.L., Tyczkojwski, J.K., Riviere, J.E. and Hamilton, P.B.(1988): Aflatoxin-Impraired Ability to Accumulate Oxycarotenoid Pigments During Restoration in Young Chickens. Poultry Sci. 67: 619-625.
- 76- Sims, W.M. J.R., Kelley, D.C. and Sanford, P.E. (1970): A Study of Aflatoxicosis in Laying Hens. Poultry Sci. 49: 1082-1089.
- 77- Smith, J.W. and Hamilton, P.B. (1970): Aflatoxicosis in the Broiler Chicken. Poultry Sci. 49: 207-215.
- 78-Smith, J.W., Hill, C.H. and Hamilton, P.B. (1971). The Effect of Dietary Modifications on Aflatoxicosis in the Broiler Chicken. Poultry Sci. 50: 768-774.
- 79-Snedecor, G.V. (1957): Statistical Methods. The Iowa State Collage Press. Ames. Iowa; XIV+534.
- 80-Surekha, M., Reddy, S.M. (1989): Influence of Temperature and Humidity on Biodeterioration and Aflatoxin Production in Groundnut Fodder by *Aspergillus flavus*. Journal of Toxicology. Toxin Reviews 8 (1-2): 291-297.

- 81-** Şanlı, Y., Ceylan, S., Kaya, S. (1982). Tavuk Yemlerinde ve Yem İlkel Maddelerinde Aflatoksinler. A.Ü.Vet.Fak.Derg. 29 (3-4): 473-492.
- 82-** Şanlı, Y., Yavuz, H., Akan, F. (1990). Kuru İncir Örneklerinde Mikotoksin Kirlilikleri. A.Ü.Vet.Fak.Derg. 37 (2): 293-308.
- 83-** Şanlı, Y. (1990). Tavuk Yetiştiriciliğinde Küflenmiş Yem Tüketimi Sorunu ve Başlıca Sakıncaları. Tavukçuluk Bülteni, Sayı 46, Pfizer Ulusal Tavukçuluk Sempozyumu 89, 41-55.
- 84-** Taştan, E.E. (1993): Kırmızı Biberlerde Aflatoksin ve Okratoksin Oluşumu Üzerinde Araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi, Yayında). Hacettepe Üniv. Müh.Fak. Gıda Müh. Böl., 23-43.
- 85-** T.S.E. (1985): Aflatoksin Tayini Metotları. Yağlı Kuru Meyvelerde. TS 4672, Ankara.
- 86-** Tuncer, N. (1987). Ankara ve Çevresinde Üretilen Yumurta Örneklerinde Aflatoksin. Etlik Vet.Mikrob. Derg. 6 (1), 101-116.
- 87-** Tuncer, N. (1990). Konya Civarında Bulunan Yem Fabrikalarında Üretilen Yem ve Yem Maddelerinde Aflatoksin B₁ ve Okratoksin A Rezidülerinin Araştırılması. Veterinarium, 1 (1) 14-17.
- 88-** Tung, H.T. and Hamilton, P.B. (1973). Decreased Serum Carotenoids During Aflatoxicosis. Poultry Sci. 52: 80-83.
- 89-** Türkmen, M. (1989). Yemlerde Aflatoksin Miktarı. Çiftlik Derg. 62: 23-24.
- 90-** Tycakowski, J.K. and Hamilton, P.B. (1987). Altered Metabolism of Carotenoids During Aflatoxicosis in Young Chickens. Poultry Sci. 66: 1184-1188.

- 91- Ünsal, A., Uzunören, N., Dağoğlu, G. (1990). Yüksek Basıncılı Likid Kromatografi ile Karma Yemlerde Aflatoksinlerin Saptanması. *Pend. Hayv.Hast.Mrkz.Arşt.Enst.Derg.* 21 (1):51-60.
- 92- WHO (1979). *Environmental Health Criteria*, 11. Mycotoxins. WHO, Ceneva, 1-27.



8.ÖZGEÇMİŞ

Malatya'nın Doğanşehir ilçesinde 24.07.1966 tarihinde doğdum. İlk ve orta tahsilimi Serik'te, lise tahsilimi ise Elazığ'da yaptım. 1983 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girerek 1988 yılında mezun oldum. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Muş İl Müdürlüğünde 2 yıl görev yaptım. Daha sonra Elazığ Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsüne atandım. Halen aynı yerde görev yapmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.



9.TEŞEKKÜR

Bu konuyu bana Doktora Tezi olarak veren ve yardımlarını gördüğüm danışman hocam sayın Prof.Dr.Mustafa SARI ile hocam sayın Doç.Dr. İ.Halil ÇERÇİ'ye, çalışmanın yürütülebilmesi için her türlü imkanı sağlayan Enstitü Müdürü sayın Dr.Celal ÖZCAN'a, toksin analizi ve identifikasyon çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Aflatoksin Laboratuvar elemanlarından sayın Dr.Nafi ÇOKSÖYLER'e, Yük.Müh. Şennur ÖZKAYA ve Yük.Müh. Esmâ TAŞTAN'a, büyük maddi ve manevi desteğini gördüğüm eşim Arş.Gör.Kazım ŞAHİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

