

*A.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Kontrolu ve Teknolojisi Kürsüsü
Prof. Dr. Zeki Tolgay*

BAZI PEYNİRLERİMİZDEN İZOLE ETTİĞİMİZ KÜFLER VE BUNLARIN AFLATOKSİN YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Aziz Demirer*

A Study of Molds Isolated from Certain Cheeses and Their Ability to Produce Aflatoxins

Summray: Molds were found in 10 samples of Konya Moldy Tulum Cheese, in 10 samples of Diyarbakır White Cheese containing a special plant and in 71 samples of Erzincan Tulum Cheese accidentally contaminated with molds.

Isolates which were identified are as follows:

130 *Penicillium roquefortii*, 2 *P. chrysogenum*, 6 *P. notatum*, 2 *P. crustosum*, 1 *Aspergillus manginii*, 2 *A. versicolor*, 1 *Cladosporium herbarum*, 1 *C. macrocarpum*, 1 *C. cladosporioides*, 1 *Alternaria alternata* and 1 *Walleimia sebi*.

Forty molds isolates were grown for seven days at 27°C on YES medium, to investigate their ability to produce aflatoxins. Thin Layer Chromatography studies indicated that, of the forty samples tested, none were found to produce any toxicity.

Özet: Bu çalışmamızda Konya Küflü Tulum Peynirlerinden ve Diyarbakır Otlu Beyaz Peynirlerinden onar numunede ve arizi olarak küflenmiş Erzincan Tulum Peynirlerinin küflü yerlerinden alınmış yetmiş bir numunede bulunan küfler izole ve idantifiye edilmiş ve bunların aflatoksinler yönünden toksinojenik kontrolleri yapılmıştır.

Muayeneler sonuncunda peynirlerden 130 *Penicillium roquefortii*, 2 *P. chrysogenum*, 6 *P. notatum*, 2 *P. crustosum*, 1 *Aspergillus manginii*, 2 *A. versicolor*, 1 *Cladosporium herbarum*, 1 *C. macrocarpum*, 1 *C. cladosporioides*, 1 *Alternaria alternata* ve 1 *Walleimia sebi* izole edilmiştir.

Bu küf suşlarından kırkının kültür ekstraktları aflatoksinler bakımından ince tabaka kromatografisi ile incelenmiş, kontrol suşu olarak kullandığımız *Aspergillus flavus* hariç hiç birinde aflatoksinlere rastlanamamıştır.

* : A.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Kontrolu ve Teknolojisi Kürsüsü Doçenti

Giriş

Son 14 - 15 yılın ilginç ve aktüel konularından biri de aflatoksin problemidir. Şüphesiz bu problem memleketimiz bakımından da önem arzemiş bulunmaktadır.

Nitekim 1967 haziranında Kanada'ya ihraç edilen ve önemli ihraç ürünlerimizden biri olan iç fındıkların, insan sağlığına zararlı aflatoksin bulunduğu iddiasıyla geri çevrilmesi ve 1970 eylülünde Amerika Birleşik Devletlerine gönderilen antep fıstıklarında aflatoksin tesbit edilmesi, memleketimiz ekonomisi ve beslenmemiz yönünden üzerinde dikkatle durulması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Antep fıstığı problemi üzerine USA Food and Drug Administration dan Dr. A. D. Campbell memleketimize gelmiş ve bu arada kürsümüzü de ziyaret ederek aflatoksin çalışmalarımız hakkında bilgi almışlardır. İlginin dönüşünden sonra Ticaret Bakanlığına vermiş olduğu ve bir kopyası bu Bakanlık tarafından kürsümüze gönderilmiş olan raporunda, çalışmalarımızdan bahsedilmesi ve aflatoksin araştırmalarında kürsümüzden istifade edilebileceğinin belirtilmesi bizlere kıvanç ve enerji vermiştir.

Nitekim 1971 yılında çeşitli gıdalarımızı kapsayan ve bir sondaj mahiyetinde olan "*Bazı Gıdalarda Aflatoksin Araştırmaları*" adı altında bir araştırma yapılarak TBTAK'ın 3. Bilim Kongresinde, 1972 yılında "*Bazı Süt ve Süt Mamüllerinde Aflatoksin Araştırmaları*" adı altında bir diğer araştırma ise 15. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde tebliğ edilmişlerdir.

Faaliyetlere ondan sonra da devam edilerek "*Süt ve Süt Mamüllerinde Aflatoksin M₁ ve B₁ Aranması Üzerinde Araştırmalar*" adı ile bir araştırma ve "*Sütle Aflatoksinlerin Ekskretedilmeleri ve Süt ve Süt Mamüllerinde Aflatoksin Tayin Metodlarında Son Gelişmeler*" adlı bir makale ilgililerin istifadesine sunulmuş ve 1973 yazında Amerika Birleşik Devletleri tarafından organize edilen kollaboratif milletler arası bir çalışmaya kürsümüzün de iştiraki sağlanmıştır.

Bilindiği gibi memleketimizin bazı bölgelerinde, amprik metodlarla küflü peynirler imal edilmektedir. Ayrıca bazı peynirler çeşitli nedenlerle arizi olarak küflenmektedirler. Bazı şahıslar, bu gibi peynirlerin küflü halde yenilmelerinde bir sakınca görmedikleri gibi, bazı küflerin antibiyotik hassaları nedeniyle küflü peynirlerden fayda dahi ummakta ve hatta tercih etmektedirler.

İşte bu durum dikkatimizi çekmiş, bu gibi peynirlerdeki küflerin hangi cins ve tür küf mantarları olduğu, bunların aflatoksinleri üretip

üretmedikleri, şayet üretiyorlarsa hangi aflatoksinleri ve ne miktar ürettiklerini saptamak bakımından "*Bazı Peynirlerimizden İzole Ettiğimiz Küfler ve Bunların Aflatoksin Yeteneklerinin Araştırılması*" adı altında memleketimiz için lüzumlu ve faydalı olabileceğini düşündüğümüz bu araştırmayı yapmayı uygun bulduk.

Literatür bilgi

Küfler, yani küf mantarları, kötü şartlarda elde edilen yahut usulüne uygun depolanmayan hububat, yem ve gıda maddelerinde, elverişli gıdalanma, rutubet ve hararet şartları bulduklarında, süratle çoğalırlar. Şayet toksinojen mantarlarsa, bir metabolit ürün olarak oluşan mycotoxin'ler nedeniyle, bunları yiyen hayvan ve insanlarda mycotoxicose'lara sebebiyet verirler. Bu durum mikroskobun keşfinden önce de çeşitli sporadik ve epidemik mycotoxicose vakalarıyla insanların dikkatini çekmiş ve araştırma konusu yapılarak muhtelif çalışmalar yayınlanmıştır.

Penicillin'in bulunmasından sonra da, Roquefort, Camembert, Gorgonzola, Stilton ve Nuworld gibi bazı peynirlerin olgunlaşmasında rol oynayan küflerin, peynire pencillin yahut benzer maddeler verip vermedikleri üzerinde durulduğunu görmekteyiz.

Wilkowske ve Krienke(66), yaptıkları böyle bir araştırmada numunelerin hiç birinde penicillin'e rastlamadıklarını bildiriyorlar.

Memleketimizde ise Akman(1), 27 Tulum ve 23 Kaşar peynirinde bulunan küfleri mütalaa ettiğini ve bunların antibiyotik etkileriyle zararsızlık derecelerini kontrol ettiğini, 34 penicillium, 5 aspergillus, 1 mucor ve 4 oidium lactis türü izole ettiğini, bu küflerin kültür filtratlarının stafilokok, streptokok, koli, tifo, paratifo A, paratifo B ve antraks suşları üzerinde değişik kuvvette antibiyotik etki gösterdiğini, 12 penicilliumda kuvvetli, 4 aspergillusta zayıf, diğerlerinde hiç bir antibiyotik etki bulunmadığını, Konya Küflü Peynirlerinden saf penicillium kültürleri elde ettiğini bunların P. roquefortii'ye müşabih olduğunu, izole ettiği bütün küflerin kültür filtratlarını ve saf kültür süspansiyonlarını laboratuvar tecrübe hayvanlarına, cilt altı, periton, kas ve vena içi yollarla enjekte ederek bu küflerin toksisitelerini aradığını, enjeksiyona tâbi tutulan tavşan, kobay ve fındık farelerinde hiç bir toksik etki tesbit edemediğini ve hayvanların hepsinin yaşadığını, küflü tulum peynirlerinin olgunlaşmasında rolü olan yahut her iki peynirin sathında bulaşma suretiyle üremiş olan peynir küflerinin zararlı bir etkileri olmadığı kanısına vardığını bildirmektedir.

Daha sonra, 1960 yılında İngilterede yüz bin kadar hindi ve sülün palazlarının ölümüne sebebiyet veren bir hastalığın patlak vermesiyle mycotoxicose problemi yeniden ilgi kazanmış(62) ve o sıralarda bu hastalığa *Hindilerin X Hastalığı* adı verilmiştir. Yapılan tetkikler bu hastalığa yakalanan hayvanların Brezilyadan gelen yer fıstığı küspesi ile imal edilmiş kompozit yemleri yediklerini gösteriyordu(54).

1961 Kasımında, Londra Tropical Products Institute'den Sargeant ve Kelly, Weybridge Central Veteriner Laboratory'den Carnaghan ve Allcroft, müşterek yayınladıkları bir araştırmada(56), bazı Brezilya yer fıstığı un numunelerinden toksik bir maddenin ekstrakte edildiğini ve bunun Hindilerin X Hastalığının aynı, karaciğerin histolojik lezyonlarıyla birlikte ördek ve hindi palazlarında ölüm meydana getirdiğini, 1 günlük ördek palazlarına konsantre ekstraktın miktarı olarak verilmesinin toksisite kontrolü bakımından çabuk ve hassas bir metod olduğunu, toksin veren mikro organizmanın muhtemelen bir mantar olabileceğini bildirmelerinden bir ay sonra yani 1961 aralığında, Sargeant, Sheridan, Kelly, ve Carnahan(55) toksin veren mikroorganizmanın bir mantar olduğunu saptadığını, bunun da *Aspergillus flavus* Link ex Fries olarak idantifiye edildiğini ortaya koyuyorlar.

Gerek bu araştırmacıların ve gerekse Lever Brothers, Massachusetts Institute of Technology'deki araştırmacılar ve diğerleri mesclenin kimyasal yönünü ve biyolojik tesirlerini araştırdılar. Araştırmalar 2 yıl içinde bu mycotoxin'in bilinen en kuvvetli karaciğer kanserojen maddesi olduğunu gösterdi(22). Ayrıca yapılan sayısız tetkiklerde, yer fıstıklarının insan beslenmesine girdiği siyah Afrika bölgelerinde hepatom vakalarının daha fazla olduğunu ortaya koydu(3).

Aflatoksin adı verilen bu toksin üzerinde yapılan kromatografik tetkikler bunun B_1, B_2, G_1, G_2 gibi komponentleri bulunduğunu meydana koydu.

Daha sonra yapılan araştırmalar, aflatoksinli küspe yiyen ineklerin, sütleriyle iki komponentli ve aflatoksin M_1 ve M_2 adı verilen bir toksin çıkardıklarını, bu toksinin küspe yiyen hayvanların idrar ve gaitalarında da bulunduğunu, ayrıca küflü yer fıstıklarında da rastlandığını gösterdi (4,5,6).

Maymun yavrularına aflatoksin yedirme denemeleride Tulpule et al. (65), günde 1 mg lık dozun daima toksik olduğunu, 2 - 4 hafta arası bütün hayvanlarda iştahsızlık ve halsizliğin arttığını, idrarın fazla renkli olduğunu ve 2 ay içinde hepsinin koma halinde öldüklerini,

yapılan biyokimyasal testlerde karaciğer fonksiyonunun fazla zarar gördüğünün ve karaciğer harabiyetinin saptandığını, bunun otopsi ile de teyit edildiğini, karaciğerin çok yağlı ve iki hayvanda portal cirrrosis'i andırır takriben 2 mm çapında üniform nodiler bir görünüşte bulunduğunu bildiriyorlar.

Aflatoksin veren mantarlar ve yayılma durumları: Aflatoksinler, bilhassa flavus grubu aspergillus'ların metabolizma ürünleridirler. Flavus grubu aspergillus'lardan başka, aspergillusların diğer bazı türleri, bir takım penicillium'lar ve diğer bazı mantarlar da aflatoksin üretebilirler. Tablo I, Goldblatt(27) tarafından bildirilen böyle bir listeyi göstermektedir.

Tablo I
In vitro olarak aflatoksin üreten mantarlar

Mantarm adı	Araştırmacılar	Aflatoksin B ₁ B ₂ G ₁ G ₂
Aspergillus flavus grubu		
A. flavus	Sargeant et al. (1961)	+ + + +
A. flavus var. columnaris	Van Walbeek et al. (1968)	+
A. oryzae	Basappa et al. (1967)	+ +
A. parasiticus	Codner et al. (1963)	+ + + +
A. parasiticus var. globosus	Murakami et al. (1966)	+ + + +
Diğer Aspergillus türleri,		
Penicillium vs.		
A. nigrum	Kulik ve Holaday (1967)	+
A. ventii	" " " "	+
A. ruber	" " " "	+
A. ostianus	Scott et al. (1967)	+ +
A. ochraceus	Van Walbeek et al. (1968)	+
Penicillium puberulum	Hodges et al. (1964)	+ +
	Kulik ve Holaday (1967)	+ + + +
P. variable	" " " "	+
P. frequentans	" " " "	+
P. citrinum	" " " "	+
Rhizopus sp	Van Walbeek et al. (1968)	+ +

Lafont (42,43), A. flavus ve A. parasiticus'un, yalnız tropikal memleketlerin yer fıstıkları ve bitkisel üretim maddeleri üzerinde değil, aynı zamanda mutedil iklimli memleketlerde yetiştirilen ekseri hububatlar üzerinde, hemen hemen devamlı bulunan, çok yaygın türler olduğunu ve mesut bir tesadüf olarak bunların bütün suşlarının toksinojen olmadığını, tabiatta zehirsiz suşların zehirliyelerden daha sık olarak rastlandığını, toksinojen suşların ne morfolojik ve ne de beslenme ihtiyaçları bakımından zehirsiz suşlardan ayrılmadıklarını kaydediyor.

Senser(58), Czapek agar ve malt agar besi yerlerinden istifade edilerek A. flavus Link, A flavus var. columnaris ve A. parasiticus

speare gibi *A. flavus* gurubundaki toksin yapan mantarların bulunması ve tespit edilmesi için çabuk bir metod tarif ediyor.

Jacquet et al. (33, 34, 35, 36, 37 38, 39) yaptıkları araştırmalarda sütlerde aflatoxin M₁'ye rastladıklarını ve fakat peynir numunelerinde en az izine dahi tesadüf etmediklerini, aspergillus'ların peynirde çoğalma konusunun çok nadir olduğunu, sahanın evvela penicillium'lara ondan sonra da mucor'lara ait bulunduğunu, patojen aspergillusları elektron mikroskopla incelediklerini; 500 den fazla gıda maddesinde, hububatta, yemlerde, toprakta ve havada *Aspergillus* sporlarının yayılışını tetkik ettiklerini, hayvan yemlerinde aflatoxin aradıklarını ve bunlar arasında aflatoxin fazlalığı bakımından ilk sırayı yer fıstığı küspesinin ikinci sırayı kompoze yemlerin aldığını kaydediyorlar.

Küflerin üretilmesi ; toksin elde etme ve araştırma metodları: Bu hususta çeşitli metodların kullanıldığını görmekteyiz.

Sargeant et al. (55), ilk defa yer fıstıklarından izole ettikleri 8 suşun saf kültürlerini Czapek solusyon agar'da 27° C de 7 gün kültür yapıp kloroformla ekstre ettiklerini, elde ettikleri toksinin bir günlük ördek yavrularında biyolojik aktivite kontrolünden ve kromatografik tetkiklerinden sonra bunun yer fıstıklarındaki toksinin aynı toksin olduğunu saptadıklarını, daha sonra, toksik olmayan ve ısı ile sterilize edilmiş yer fıstıkları üzerinde aflatoxin veren mantarları ürettiklerini ve yer fıstığının kilogramında 100 mg aflatoxin elde ettiklerini bildiriyorlar.

Scott et al. (57), hububat ve sebzelerden elde ettikleri 58 türü temsil eden 228 küf suşunu toksijenik yönden incelediklerini, mısır unlarını saf kültürle enfekte edip küfün gelişimini sağladıktan sonra pekin ördek yavrularını besleyerek teste tâbi tuttuklarını kaydediyorlar.

Joffe(40), küf sporlarını erlenmeyer içerisinde musluk suyu ile evvelce ıslatılmış 10 g buğday üzerine ekerek 24° C de 8 gün enkübe ettiğini, sonra bunlarda ekstraksiyon ve ince tabaka kromatografisi metoduyla aflatoxin aradığını bildiriyor.

Hodges et al. (31), küflü bir yer fıstığı nümunesinde *Penicillium puberulum* Bainer'e rasladıklarını, bunu kırılmış buğday, patates, bira mayası, patates dekstroz agar ve Sabouraud agar gibi kültür besi yerlerinde çoğalttıkları ve bunların aflatoxin sentezlediklerini kaydediyorlar.

Ashwoth et al. (9), araştırmalarında, aspergillus ve penicillium türlerinin kültürü için malt salt agarı ve asitleştirilmiş (pH 5,5) pata-

tes dekstroz agarı, diğer türlerin kültürü için sadece malt salt agarı kullandıklarını, kültürleri cam pamuğu ile tıkanmış polietilen torbalarda 30°C de 10 gün enkübe ettiklerini bildiriyorlar.

Chang et al. (15), ezilmiş buğday üzerinde çoğaltılmış kültürlerden B₂ aflatoksinini elde ettiklerini, bu komponentin biyolojik aktivitesini bir günlük, erkek, beyaz pekin ördek yavrularında tesbit ettiklerini, aktivitenin kriterleri olarak gelişmenin azalması, karaciğer ve safra yollarının hiperplazisi olduğunu kaydediyorlar. Allard (3), fena şartlarda elde edilmiş bir buğday partisinden izole ettiği bir A. versicolor ve kültür toprağından ayırdığı bir penicillium suşu ile çalıştığını, hububatlar üzerinde yapılan kültürlerin miktarı olarak ekstre etmedeki güçlükleri sebebiyle, aflatoksin elde etme besiyeri olarak litresinde 27 g saccharose bulunan patates temelli sıvı besiyerini kullandığını kaydediyor. Boutibonnes ve Jacquet(13), A. flavus tarafından aflatoksin sekresyonunda rol oynayan şartları bildiriyorlar. Eldridge et al. (21), içerisinde karbohydrate'ları, vitaminleri, mineralleri ve organik nitrojen bileşikleri taşıyan sentetik sıvı besiyerini tarif ediyorlar. Bu besiyerinde A. flavusu 25°C de 8 gün kültür yaptıklarını, A. flavus suşuna göre besiyerinin litresinden 10 – 110 mg mahsul aldıklarını kaydediyorlar. Frayssinet ve Lafont (24), 112°C de 45 dakika sterilize ettikleri %10'u ezik mısır daneleri üzerinde 110 aspergillus suşunu 30°C de 8 gün kültür yaptıklarını, sonra 100ml besiyerine 200 ml kloroform koyarak 1 saat müddetle kaynatıp 3 defa ekstre ettiklerini, kloroformu uçurup 1:1 metanol ve susuz heksana aldıklarını, bunu ayırma hunisine geçirip fazların ayrılması için %13 su ilave ettiklerini ve metanol fazını 1 günlük ördek yavrularına ağız yahut periton yolu ile vererek toksisite kontrolleri yaptıklarını bildiriyorlar. Petit et al. (51), iki suşla yaptıkları aflatoksin araştırmalarında, sıvı vasat olarak malt ekstresi ve Czapek solüsyon, katı vasat olarak az nemli, steril mısır daneleri kullanarak 7 gün kültür yaptıklarını, enkübasyon nihayetinde kültürleri 30 dakika 100°C de otoklavladıktan sonra ekstre ettiklerini ve kültür yaparken de yeteri kadar havalandırmanın lüzumlu olduğunu belirtiyorlar. Hesseltine et al. (30), muhtelif atrastırıcılara atfen, çeşitli suşların kültürlerinde Czapek solüsyon, yer fıstığı unu, kabuğu soyulmuş ve ezilmiş yer fıstığı, tüm buğday, parçalanmış yahut ezilmiş buğday, ezilmiş ve sterilize edilmiş buğday kullanıldığını, Czapek solüsyonun tavsiye edilmemesine rağmen kendilerinin patates dekstroz brot'ta, durgun kültür halinde bol aflatoksin aldıklarını, araştırmalarında sporlarda da aflatoksin tespit ettiklerini ve bu hususun bu konuda çalışanlar için çok önemli olduğunu, toksinin otoklavlandıktan sonra dahi aktif kaldı-

ğını ve bu nedenle materyale elle dokunulmamasını, çok kuvvetli bir karsinojen madde olması sebebiyle özel araştırmaya ihtiyaç gösterdiğini, kültürlerden en yüksek mahsülü 28 °C de 5 günde elde ettiklerini, daha fazla bekletilirse azalma husule geldiğini, bu azalmanın belki de bir enzimatik faaliyet sebebiyle olabileceğini bildiriyorlar. Nesbitt et al (44), aflatoksin mahsülünü artırmak için içerisine çinko sulfat ilave edilmiş Czapek-Dox besi yeri kullandıklarını, Wiseman et al. (67,68), pirinç ve saman üzerinde *A. flavus* kültürleri yapıldığında, aflatoksinlerin ekstraksiyonu ve izalasyonunda bazı pigmentlerin aflatoksinleri ısrarla takip ettiklerini ve kromatografik separasyonlarda onları örtebildiklerini, bu nedenle kloroformu, % 1 bakır karbonat ihtiva eden etil alkolle kısa bir döndürerek çalkalama ve süzme işleminden geçirerek bu pigmentlerin bertaraf edilebileceklerini bildiriyorlar. Davis et al. (16), YES medium adını verdikleri % 2 yeast ekstrakt ve % 20 sucrose ihtiva eden yarı sentetik bir besi yerini tarif ediyorlar ve bu sıvı besi yerinde, *A. flavus* tarafından B₁ ve G₁ aflatoksinlerinin üretimine tesir eden kültür şartlarını araştırdıklarını, *A. flavus*'un bir çok suçlarının toksin verme kaabiliyetlerini mukayese ettiklerini, besi yerine ilave ettikleri besleyici maddelerin hiç birinin toksin üretimini artırmadığını, yüksek seviyede toksin elde edilmesi için, küflere bu besi yerinin, muhtemelen bütün besleyici maddeleri temin ettiğini, besi yerinde pH ayarlamasının aflatoksin üretiminde bir rolü olmadığını, bu besi yerinin hazırlanmasının kolay, maliyetinin nisbeten ucuz olduğunu, diğer besi yerlerinden daha yüksek seviyede aflatoksin verdiğini, bu sebeple YES besi yerinin aflatoksin üretilmesi ve mantarların aflatoksin üretme kaabiliyetlerinin araştırılması için uygun olduğunu bildiriyorlar.

Aflatoksin Konusunda Memleketimizde Yapılan Araştırma ve Yayınlar :

Memleketimizde aflatoksin konusunda ilk araştırma Güray ve Vural (28), tarafından fındıklar üzerinde yapılmış, Girgin (26), Elazığ yöresindeki sığırlarda görülen meycotoxicose'ları bildirmiştir. Omurtag (45), salçalardaki küfler üzerinde, Akşehirli ve Bozkurt (2), fındıklar üzerinde çalışmışlardır. Tolgay, Demirer, Tezcan, Yurtyeri (64), çeşitli gıdalar üzerindeki aflatoksin araştırmasını TBTAK'ın 3. Bilim Kongresinde, Demirer (17), süt ve süt mamülleri üzerindeki araştırmasını 15. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde tebliğ etmişlerdir. Denizel ve Köşker (20), İngiliz yer fıstıkları üzerinde, Demirer (18), süt ve mamülleri üzerinde ve Stubblefield ile Shannon'la birlikte (60) kollaboratif bir çalışmada süt ve mamüllerinde aflatoksin M₁ araması ve identifiye edilmesi üzerinde, Bozkurt et al. (14) fıstıklar üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Ayrıca mantarlar ve aflatoksin konusun-

da daha bazı yayınlara rastlamaktayız (7, 8, 11, 12, 19, 29, 32, 46, 48, 50, 63).

Materyal

Materyal olarak, küflü peynir adıyla Konya'da imal edilen, Konya Küflü Tulum Peynirlerinden ve Diyarbakırda otlu peynir olarak yapılan Diyarbakır Otlu Beyaz Peynirlerinden 10 ar nümune ve arizi olarak küflenmiş Erzincan Tulum Peynirlerinden 71 nümune olmak üzere toplam olarak 91 nümune alarak, bunlardaki küflerin izolasyonları ve identifikasyonları üzerinde çalıştık.

Ayrıca, bu peynir nümunelerinden izole ettiğimiz küf suşlarından muhtelif cins ve türlere ait 40 adedini seçerek, bunları, aflatoksin üretip üretmedikleri yönünden araştırmaya tâbi tuttuk.

Metodlar

1- *Ekim için peynir dilüsyonlarının hazırlanması*: Steril şartlarda, saat camı üzerinde, peynirlerden 1 g tartarak havana koyduk. Peynir nümunesini sübye haline getirmek için, evvela üzerine 1 ml steril % 20 lik sodyum sitrat eriyiği ilave ederek hamur haline getirdik. Daha sonra 45° C deki 8 ml % 0,1 agarlı steril sudan havana azar azar ilave edip, bundan süt benzeri homojen bir süspansiyon yaparak bir deney tüpüne aktardık. Böylece peynirlerin 1/10 dilüsyonlarını elde ettik. Bunlardan da 1/100, 1/1000, 1/10.000 lik dilüsyonları hazırladık (49).

2- *Küf İzolasyon Metodu*: İçlerinde ARBA agar (47) ve Czapek-Dox agar (25) besi yerleri bulunan petri kutularına, peynir, dilüsyonlarının, sürtme ekim metoduyla ekimlerini yaptık. Plakları 27°C de 3-7 gün etüve koyduk. Plakalarda gelişen izole, tek küf kolonilerini alarak saflaşmaları için tekrar ekimlerini yaptık. İkinci ekimlerinde gelişen tek kolonileri, tetkik edilmek üzere, tüplerdeki, yatık Sabouraud muhafaza agarına aldık.

3- *Lam Üzerinde Mikro Kültür Metodu*: Küflerin mikroskopik muayeneleri için, lam kültür metodunu uyguladık (11). Bunun için petri kutularının içinde, cam borudan yapılmış ızgalaralar üzerinde bulunan ve beraberce sterilize edilen 2 lam'dan biri üzerine 2 damla Czapek-Dox agar, diğeri üzerine 2 damla patates dekstroz agar damlatarak dondurduk. Diğeri taraftan, muayene cdeceğimiz suşu, önceden, yatık Sabouraud agardaki kültürden alarak, plaktaki dekstroz

agarda, tek koloni düşecek tarzda ekimini yaptık. Plaktan tek koloni alarak 0,5 ml kadar sulandırma solüsyonunda sulandırdık. İşte bu solüsyondan öze ile alarak, petri kutularındaki besi yeri ihtiva eden lamalar üzerine ekim yaptık. Gerekli rutubetin sağlanması ve besi yerinin kurumaması için petri kutusunun dib kısmına 1 ml kadar steril su koyarak, bunların 27 °C lik etüvde 3–21 gün gelişmelerini sağladık. Böylece hazırladığımız bu lam kültürlerini, evvela doğrudan doğruya ve üzerine 1–2 damla lactophenol koyup nemlendirerek natif şekilde, daha sonra Amonn'un cotton blue'ü latophenol'u ile boyayarak mikroskopta tetkik ettik.

4- *Küf suşlarının teşhis ve idantifikasyonları*: İzole ettiğimiz küf suşlarını Czapek–Dox agar, patates dekstroz agar, Sabouraud agar, ARBA agar, YES medium besi yerlerinde kültür yaparak gelişme durumlarını 48 saatten itibaren 3 haftaya kadar izledik. Lup vasıtasıyla kolonilerin yapılarını, şeklini, kenarlarının agar üzerinde aldığı biçimleri, tozlanmaları tetkik ettik. Ayrıca kolonilerin büyüme ve yayılma süratlerini, koloninin ve besi yerinin renk durumlarını, sulanmaları, gelişmenin kabuk yahut koloni şeklinde veya özel bir tarzda olup olmadığını inceledik. Bundan başka diseksiyon mikroskopu ile aerial miselleri tetkik ettik. Lam kültürlerinin mikroskopla tetkikleri esnasında, küflerin spor, hypha, mycelium, septa. conidia, conidiophore, sterigma, sporangium, sporangiophore, columella v.s. gibi yapı elemanlarına dikkat ederek penicillium'ların idantifikasyonları için Raper et al. (52), aspergillusların idantifikasyonları için Raper ve Fennel (53), diğerlerinin idantifikasyonları için Smith (59), Frazier (23), Barnett (10) ve Tanner (61) in eserlerinden yararlandık.

5- *Küflerin Aflatoksin Yeteneklerinin Araştırılması İçin Kültürleri*:

Bu maksat için Davit et al. (16),nın tavsiye ettikleri, % 2 yeast extract ve % 20 sucrose ile hazırlanan YES medium besi yerini kullandık. Besi yerini 100 ml lik erlenmeyerlere 30 ar ml olarak tevzi ettik. Ağızlarını kalay kağıdı ile gevşek bir şekilde yapatarak, 121 °C de 15 dakika sterilize ettik. Diğer taraftan kültürlerini yapacağımız ve tablo III te adlarını ve sayılarını verdiğimiz küf suşlarının yatık sabouraud muhafaza agarındaki 1–3 haftalık kültürlerinin sporlarını 1 ml sulandırma solüsyonunda süspansiyon haline getirerek bu süspansiyonu erlenmeyerlerdeki besi yerlerine steril şartlarda ilave ettik. Erlenmeyerleri 27 °C de 7 gün etüvde beklettikten sonra üremeye son vermek için üzerlerini bir miktar kloroform ile örterek su banyosunda 70 °C de 15 dakika ısıttık. Bundan sonra buz dolabına naklettik.

6- *Kültür Ekstraktlarında Aflatoksin Araştırılması*: Demirer (18), tarafından tarif edilen metodu, kültür sıvısında aflatoksin aratırması için kullandık. Besi yerini kağıttan süzdükten sonra aflatoksinlerin ekstraksiyonu için aşağıdaki şekilde hareket ettik. Mikserin kavanozuna 10 ml kültür sıvısı, 37 ml distile su, 60 ml methanol, 50 ml hexan ve 1 g sodyum klorür koyduktan sonra mikseri yüksek devirle 2 dakika çalıştırdık. Sonra 3 ml kurşun asetat solüsyonu ilave ederek 1 dakika, 3 ml doymuş sodyum sulfat ilave ederek yine 1 dakika alçak devirle karıştırdıktan sonra metodu takip ettik. Muameleler sonunda elde ettiğimiz kloroform ekstrakt kalıntısını, kolon kromatografisine tâbi tutmadan 0,1 ml kloroformda sulandırıp ince tabaka plakalarına 10 mikrolitre olarak tatbik ettik. Plakaları evvela di etil eterle sonra developman slovent sistemi ile developpe ederek, çeker ocakta, karanlıkta kuruttuktan sonra, ultraviyoleet lamba altında tetkik ettik.

Bütün bu çalışmalarımızda Amerika Birleşik Devletlerinden getirttiğimiz *Aspergillus flavus* (NRRL 3251) suşunu ve B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ve M₂ aflatoksinlerini kontrol olarak kullandık.

Aflatoksin bulaşmalarından korunmak için NaOCl den istifade ettik.

Sonuçlar ve Tartışma

Sonuçları vermeden evvel bazı hususların açıklanmasını faydalı görmekteyiz.

Diyarbakır da imal edilen otlu beyaz peynirlerden nümune seçmemizin nedeni, sıcak bir iklim ortamında imal edilen bu peynirlere karıştırılan otlu birlikte toksinojen küflerin peynire geçip geçmediğini tesbit etmektir.

Konya küflü tulum peynirlerinden nümune seçmemizin nedeni ise, hiç bir ilmi kontrol olmadan, tamamen ampirik bir şekilde peynirlere ilave edilen küflerin hangi cins ve türler olduğunu ve toksinojen olup olmadıklarını anlamaktır.

Nümunelerimizin en büyük çoğunluğunu teşkil eden ve arazi olarak küflenmiş, Erzincan tulum peynirlerinin küflü yerlerinden nümune almamızın nedeni ise, bu peynirlere arizi olarak bulaşan ve küflenmelerine sebep olan küflerin yine cins ve türlerini tesbit etmek ve toksinojen olup olmadıklarını açıklığa kavuşturmaktır. Zira bu üç husus da halk sağlığı bakımından büyük önem taşıyordu. Çalışmamızın baş kısmında da belirttiğimiz gibi, bazı kimseler peynirlerin küflü yerlerini yemekte sakınca görmemekte, hatta yedikleri bu küf-

lerden antibiyotik hassa mülahazası ile fayda dahi ummaktadırlar. Halbuki aflatoksinlerle olabilecek bir bulaşmanın, ne kadar tehlikeli olabileceği, yapılan çeşitli neşriyatlardan açıkça anlaşılmaktadır.

Diğer bir husus da, bu çalışmamızın normal peynirlerde yapılmış bir küf araştırması, bir küf sayımı olmadığı hususudur. Zira çalışmamız arazi olarak küflenmiş yahut modern teknolojik yöntemlerden uzak bir şekilde, ampirik olarak küflü yahut otlu peynir elde etme metodlarıyla elde edilmiş peynirler üzerinde yapılan bir araştırmadır. Bu nedenlerle elde edilen sonuçları da, normal peynirlere göre değil, kusurlu peynirlere göre değerlendirmek gerekmektedir.

İşte yukarda belirttiğimiz kalitede, peynir nümuneleri üzerinde yaptığımız, küf izolasyonu ve identifikasyonu araştırmaları sonucunda, bu peynir nümunelerinden 148 adet küf suşu izole ettik. İncelemelerimizde, 148 küf suşunun çok büyük çoğunluğunun penicillium'ları kapsadığını, diğer cinslerin tek tük bulunduğunu tesbit ettik. Bazı türler bakımından, idantifikasyonlarımız üzerindeki tereddütlerimizin giderilmesi ve teyidi gayesiyle, bunlar arasından seçtiğimiz 54 suşu, Hollanda'daki Centraalbureau Voor Schimmelcultures'e gönderdik. Buradan aldığımız sonuçlarla, diğer 94 küf suşunun idantifikasyonlarını kontrol ederek, 148 suşa ait elde ettiğimiz sonuçları Tablo II de bildirdik.

Tablo II

Peynirlerden izole ve idantifiye edilen küfün adı	Sayısı
<i>Penicillium roquefortii</i> Thom	130
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	2
<i>Penicillium notatum</i> Westling	6
<i>Penicillium crustosum</i> Thom	2
<i>Eurotium manginii</i> — <i>Aspergillus manginii</i> conid. stade	1
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	1
<i>Cladosporium macrocarpum</i> Preuss	1
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link ex. Fr.	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres). de Vries	1
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	2
<i>Wallemia sebi</i> (Fr.) von Arx	1
Toplam	148

Nümunelere göre küflerin dağılımı ise şöyle idi: Arizi olarak küflenmiş Erzincan Tulum Peynirlerinde, *P. roquefortii*, *P. crustosum*, *P. notatum*, *P. chrysogenum*, *A. manginii*, *A. versicolor*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. macrocarpum*, *Alternaria alternata* ve *Wallemia sebi*.

Konya Küflü Tulum Peynirlerinde: *Penicillium roquefortii*.

Diyarbakır Otlı Beyaz Peynirlerinde: *P. notatum*, *P. roquefortii*.

Bu sonuçlara göre, tamamen empirik olarak imal edilen Konya Küflü Tulum Peynirlerinde sadece *P. roquefortii*'nin tesbit edilmesi son derece memnun edici ve sevindirici bir sonuçtur. Bilindiği gibi *P. roquefortii*, modern metodlarla imal edilen Roquefort peynirinin olgunlaşmasında ve aroma kazanmasında rol oynayan ve onun içerisine, kültür metodlarıyla ilmi bir şekilde elde edilerek ilave edilen bir küftür. Bu güne kadar hiç bir toksik metaboliti tesbit edilmeyen bu küfün Konya Tulum Peynirlerine ampirik olarak ilave edilebilmesi hayret edilecek büyük bir başarıdır.

Diyarbakır Otlı Peynirlerinde ve arazi olarak küflenmiş Erzincan Tulum Peynirlerinde de rastladığımız diğer küflerinin toksinojen olmaması yanında, bilhassa *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Penicillium puberulum* gibi aflatoksin üreten toksik suçlara rastlanmaması memnun edicidir.

Peynirlerimiz üzerinde çalışan Karasoy (41), Marpman'ın peynirlerden 21 *saccaromycet*, 5 *penicillium*, 7 *aspergillus*, 2 *eurotium*, Ulscheck'in 15 *penicillium* izole ettiklerini, kendisinin 26 *penicillium*, 1 *aspergillus*, 1 *mucor* izole ettiğini kaydetmekte, Akman (1), ise 34 *penicillium*, 5 *aspergillus*, 1 *mucor* ve 4 *oidium lactis* ayırdığını bildirmektedir.

Bu sonuçlara göre, bizim bulgularımız, peynir nümunelerimizin çoğu arizi küflü peynirler olmasına rağmen, esas itibarıyla Karasoy'un, Akman'ın ve Ulscheck'in bulgularına uygun düşmekte, buna mukabil Marpman'inkine ters gelmektedir. Fakat, bu araştırmacının beyaz peynirler üzerinde çalışmış olmasının bu durumu doğurduğu kanısındayız.

Diğer taraftan peynirlerden izole ettiğimiz suçlardan bir kısmı üzerinde aflatoksin üreten üretmediklerini saptamak için yaptığımız araştırmaların sonuçlarını Tablo III de bildirdik.

Tablonun tetkikinden anlaşılacağı üzere, kontrol olarak kullandığımız *A. flavus* haricindeki 40 adet küf suçunun hiç birisi aflatoksin üreticisi değildi. Öyleki aflatoksinlerin hiç birini iz halde dahi üretmiyorlardı.

Kontrol olarak kullandığımız *A. flavus* ise aflatoksin B₁, B₂, M₁, M₂ aflatoksinlerini üretiyordu. Diğer taraftan *A. flavus* kültürlerini 121 °C de 15 dakika otoklavladığımız halde dahi toksisitelerini devam ettiriyorlardı.

Tablo III

Aflatoksin aranan küf sayısı	Küfün adı	Aranılan aflatoksinler B ₁ B ₂ G ₁ G ₂ M ₁ M ₂
1	Aspergillus flavus (Kontrol)	+ + - - + +
1	A. manginii	- - - - - -
2	A. versicolor	- - - - - -
1	Alternaria alternata	- - - - - -
1	Cladosporium herbarum	- - - - - -
1	C. macrocarpum	- - - - - -
1	C. cladosporioides	- - - - - -
1	Wallemia sebi	- - - - - -
22	Penicillium roquefortii	- - - - - -
2	P. chrysogenum	- - - - - -
6	P. notatum	- - - - - -
2	P. crustosum	- - - - - -

Elde ettiğimiz bu sonuçlar Akman (1) ve Demirer (17, 18) in evvelce varmış oldukları sonuçları da teyit eder mahiyettedir.

Peynirlerimizde toksinojen suçlara rastlamamız muhakkakki memnun edicidir. Ancak endişelerimizi yine de muhafaza ettiğimizi burada belirtmek isteriz. Zira Peynircilik teknolojimiz bu ampirik durumlardan kurtarılıp, modern bir hale konmadıkça, maddi ve manevi zararlarla her an karşılaşmamız mümkün görülmektedir.

Sonuç olarak bu araştırmalarımızdan endidiğimiz kanaat, sayısız fayda ve zararları olan mantarların önemlerinin memleketimizde bugüne kadar lâyikiyle anlaşılmamış olmasıdır. Eğer sağlıklı yaşamak, bunların her türlü zararlarından korunmak ve faydalı yönlerinden istifade etmek istiyorsak, bir Devlet Mycologie Enstitüsünün kurulmasını mutlaka sağlamak zorundayız. Ayrıca, peynir ve süt teknolojisinin gelişmesi bakımından, süt teknolojisi teknisyeni okullarının ve bir Laktik Kültürleri Hazırlama Merkezinin kurulmalarının artık büyük bir ihtiyaç haline geldiğini de kabul etmek zorundayız. Zira, modern peynir imalathanelerinin memleketimizin en ücra yerlerine kadar yayılarak, teknoloji ve hijyen bilgilerine sahip teknisyenlerle donatılması, memleketimize her yönden büyük yararlar sağlayacaktır.

Literatür

- 1- **Akman, N.** (1955): *Yurdumuzun Tulum ve Kaşar Peynirlerinde Rastlanan Küflerin Antibiyotik Etkileri ve Zararsızlık Dereceleri*. M.M. V. As. Vet. Biyoloji Enstitüsü Orijinal Çalışmalarından No 21, Ankara.
- 2- **Akşehirli, M., Bozkurt, M.** (1969): *Memeleketimiz Fındık, Fıstık, Badem İçi ve Cevizlerde Aflatoksin (Mycotoxin) Bakımından Bir Araştırma*. Türk Hij. Tec. Biyol. Derg. 29, 2. 103-112.

- 3- **Allard C.** (1965): *Modalités de la Production des Aflatoxines*. Phytat. Phytopharm. 14, 81-87.
- 4- **Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A.** (1962): *Groundnut Toxicity Aspergillus Flavus Toxin (aflatoxin) in Animal Products*. Preliminary Communication Vet. Rec. 74. 863-864.
- 5- **Allcroft, R., Carnaghan R.B.A.** (1963): *Groundnut Toxicity: An Examination for Toxin in Human Food Products from Animals Fed Toxic Groundnut Meal*. Vet. Rec. 75, 259-263.
- 6- **Allcroft, R., Roberts, B.A.** (1968): *Toxic Groundnut Meal: The Relationship Between Aflatoxin B₁ Intake by Cows and Excretion of Aflatoxin M₁ in Milk*. Vet. Rec. 82, 116-118.
- 7- **Alperden, İ.** (1972): *Mycotoxin'lerin Gıda Hijyeni Yönünden Önemleri ve Analiz Metodlarının Ana Prensipleri*. Born. Vet Araş. Enst. Derg. 13. 89-116.
- 8- **Altan, Y.** (1969): *Evcil Hayvanların İç ve Deri Hastalıkları*. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları 293, Ders Kitabı, 141. A.Ü. Basımevi, Ankara.
- 9- **Ashworth, L.J., et al.** (1965): *Aflatoxins: Environmental Factors Governing Occurrence in Spanish Peanuts*. Science. 148, 1228-1229.
- 10- **Barnett, H.L.** (1956): *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, Burgess Publishing Co. Minneapolis.
- 11- **Başkaya, H., et al.** (1972): *Mantarlar ve Mantar Enfeksiyonları*, 428-516 "As quoted" *Evcil Hayvanların Enfeksiyöz Hastalıkları*, Cilt-I-, A.Ü. Vet. Fak. Yayını 283, Ders Kitabı 184. A. Ü. Basımevi Ankara.
- 12- **Belli, M. (Mimoğlu, M)** (1948): *Paraziter Mantarlar ve Muayene Tekniği*. M. Nevuc -Lemaire ve M. Langeron'dan Çeviri. Y.Z.E. Basımevi Ankara.
- 13- **Boutibonnes, P., jacquet, j.** (1967): *Recherches Sur la Production de Toxin Par Aspergillus flavus*. Bull. Acad. Vét. 40, 393-403.
- 14- **Bozkurt, M., et al.** (1973): *A Study on Aflatoxins in Turkish Pistachio Nuts*. Türk Hij. Tec. Biyol. Derg. 32, 3, 221-223.
- 15- **Chang, S.B., et al.** (1963): *Aflatoxin B₂ Chemical Identity and Biological Activity*. Science, 142, 1191-1192.
- 16- **Davis, N.D., et al.** (1966): *Production of Aflatoxins B₁ and G₁ by Aspergillus flavus in a Semisynthetic Medium*. Appl. Microbiol. 14, 378-380.

- 17- **Demirer, M.A.** (1972): *Ankara Piyasasında Satılmakta Olan Bazı Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoxin Araştırmaları*. 15. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, 346-349. Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- 18- **Demirer, M.A.** (1973): *Süt ve Süt Mamüllerinde Aflatoxin M₁ ve B₁ Aranması Üzerinde Araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg. XX, 2-3, 421-443.
- 19- **Demirer, M.A.** (1973): *Sütle Aflatoxinlerin Ekskrete Edilmeleri ve Süt ve Süt Mamüllerinde Aflatoxin Tayin Metodlarında Son Gelişmeler*. A.Ü. Vet. Fak. Derg. XX, 2-3, 444-453.
- 20- **Denizel, T., Köşker, Ö.** (1972): *A Mycological Survey of Various Kinds of Edible Nuts Commercially Available in the U.K. with Reference to Mycotoxins*. A.Ü. Ziraat Fak. Yıllığı 168-199.
- 21- **Eldridge, D.W., et al.** (1965): *Aflatoxin Production by Aspergillus flavus in a Chemically Defined Liquid Medium*. Phytopathology 55, 498.
- 22- **Fischbach, H., Rodricks, J.V.** (1973): *Current Efforts of the Food and Drug Administration to Control Mycotoxins in Food*. AOAC 56, 767-770.
- 23- **Frazier, W.C.** (1967): *Food Microbiology*. Mc Grow-Hill Book Company New-York.
- 24- **Frayssinet, C., Lafont, P.** (1969) *Production Par des Aspergillus de Mycotoxines Differentes des Aflatoxines*. Anal. Inst. Past. 116, 331-340.
- 25- **Galloway, L.D., R. Burgess.** (1952): *Applied Mycology and Bacteriology*. 9. Eden Street, N.W.1. London. PP. 184.
- 26- **Girgin, H.** (1968): *Elazığ Yöresinde Mycotoxicosis Olayları ve Patolojik Bulgular*. Etlik Vet. Bakt. Ens. Derg. 3,5-6, 84-103.
- 27- **Goldblatt, L.A.** (1972): *Aflatoxin Scientific Background, Control and Implications 2 nd Ed.* Academic Press, New-York and London 1-472.
- 28- **Güray, Ö., Vural, N.** (1968): *Mycotoxinlerle Meydana Gelen Besin Zehirlenmeleri Münasebetile Aflatoxinler Üzerine Bir Araştırma*. A.Ü. Tıp Fak. Mec. 21, 4, 1030-1044.
- 29- **Gürcan A.** (1968): *Orta Anadolunun Bazı İllerinde Yaprakları ve Meyveleri Yenilen Sebzelede Zazar Yapan Mantari Hastalıkların Türleri, Yayılış Alanları, Zarar Şekilleri ve Geçiş Yolları Üzerinde Araştırmalar*. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları 325, A.Ü. Basımevi.

- 30- **Hesseltine, C.W., et al.** (1966): *Aflatoxin Formation by Aspergillus flavus*. Bacteriol Rev. 30, 795-805.
- 31- **Hodges, F.A., et al.** (1964): *Mycotoxins: Aflatoxin Isolated from Penicillium puberulum*. Science, 145, 1439.
- 32- **İnal, T., et al.** (1972): *Küfler ve Et Mamulleri bakımından Taşıdıkları Önem*. Bornova Vet Araş. Enst. Derg. 13, 77-88.
- 33- **Jacquet, J., Boutibonnes, Ph.** (1967): *Recherches sur les Caractères des Aspergillus pathogènes, Les Espèces Majeures, A. fumigatus, A. clavatus, A. flavus*. Bull. Acad. Vét. 40, 169-180.
- 34- **Jacquet, J., Boutibonnes, P.** (1967): *Recherches sur les Caractères des Aspergillus pathogenes. Les Espèces Mineures*. Bull. Acad. Vét. 40, 489-500.
- 35- **Jacquet, J., Boutibonnes, P.** (1969): *Sur la Fréquence et la Répartition des Spores d' Aspergillus*. Conséquences Hygiéniques. Bull. Acad. Nat., Méd. 153, 647-653.
- 36- **Jacquet, j., et al** (1970): *Sur la Présence des Flavatoxines dans les Aliments des Animaux et dans les Aliments d' Origine Animale Destinés à l'Homme*. Bull. Acad. Vét. 43, 35-43.
- 37- **Jacquet, J., et al.** (1970): *Fréquence Actuelle des Flavatoxines dans les Aliments du bétail*. Extrait du Procès-Verbal de la Séance du 11 Février 187-200.
- 38- **Jacquet, J., et al.** (1971): *Recherche des Flavacoumarines par Chromatographie en Couche Mince. Importance de la Discrimination des autres Taches Fluorescentes*. Bull. Acad. Vét. 44, 263-275.
- 39- **Jacquet, J.,** (1973): *Les Aflatoxines ou Flavacoumarines et leur Propriétés*. Cas du lait et des Produits Laitiers. Technique Laitière 28, 775, 27-29.
- 40- **Joffe, A.Z.,** (1969): *Aflatoxin Produced by 1626 Isolates of Aspergillus flavus from Groundnut Kernels and Soils in Israel*. Nature Lond. 221, 492.
- 41- **Karasoym, M.,** (1955): *Yurdumuz Peynirlerini Olgunlaştıran Mikroplar ve Anzimleri*. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları 67, Çalışmalar 36, Yeni Desen Matbaası, Ankara.
- 42- **Lafond, P., Lafont, j.** (1969): *Pollution Par des Aspergillus de Produits Végétaux*. Annales Inst. Pasteur. 116, 237-245.
- 43- **Lafont, P.** (1973): *Pollution des Aliments par les Mycotoxines*. Rec. Méd. Vét., 149, 231-238.

- 44- **Nesbitt, B.F., et al.** (1962): *Toxic Metabolites of Aspergillus flavus*. Nature 195, 1062-1063.
- 45- **Ömurtag, C.** (1968): *Termal İşlem Uygulanan Domates Konserveleri ile Piyasada Açık Satılan Domates Salçalarının Besin Hijyeni Bakımından Küf Sayımı Üzerinde Araştırma*. Türk Vet. Hek. Dern. Derg. 38, 11, 3-6.
- 46- **Onul, B.** (1950): *Tıbbi Mikoloji. Patojen Mantarlar ve Enfeksiyonları*. Türkiye Matbaacılık ve Gazetecilik A.O. Yeni Matbaa, Ankara.
- 47- **Overcast, W.W., Weagley, D.J.** (1969): *An Aureomycin-Rose Bengal Agar For Enumeration of Yeast and Mold in Cottage Cheese*. Milk Fd. Tech. 32, 442-445.
- 48- **Öner, M.** (1971): *Mikoloji I, II*, Ege Ü. Matbaası. Bornova.
- 49- **Özer, İ.** (1964): *Türkiye Salamura Beyaz Peynirlerinin Olgunlaşmasında Rol Oynayan Laktik Asit Mikroflorası Üzerinde Araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları 170, Çalışmalar 72, A.Ü. Veteriner ve Ziraat Fakülteleri Basımevi.
- 50- **Pamukçu, M.** (1968): "as quoted" *Veteriner Patoloji, I. Cilt, Sindirim Sistemi Hastalıkları*. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları, 228, Ders Kitabı 130, A.Ü. Basımevi. Küflü Besin maddelerinden İleri Gelen Zehirlenme. 355-357.
- 51- **Petit, J.P., et al.** (1964): *Recherches Sur L'aflatoxine. Revue des Travaux Effectuees Pendant le Premier Semestre 1964 dans les Laboratoires Centraux de L' I.E.M.V.T., "As quoted" Rev. Elev. Med. Vét. Pays. Trop. 17, 239-253.*
- 52- **Raper, K.B. et al.** (1949): *A Manual of the Penicillia. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.*
- 53- **Raper, K.B. and Fennel, D.I.** (1965): *The Genus Aspergillus*. Baltimore, The Williams and Wilkis Company, Baltimore.
- 54- **Sargeant, K., et al.** (1961): *Groundnut Toxicity*. Vet. Rec. 73, 865.
- 55- **Sargeant, K., et al.** (1961): *Nature* 192 (4807), 1096-1097.
- 56- **Sargeant, K., et al.** (1961): *The Assay of a toxic Principle in Certain Groundnut Meals*. Vet. Rec. 73, 1219-1223.
- 57- **Scott, D.B., Csr Microbiology Research Group** (1965): *Toxicogenic Fungi Isolated From Cereal and Legume Products*. Supplement-South African journal of Nutrition "As quated" Abstract A.S. Medical Journal. 39, 767.

- 58- **Senser, F.** (1967): *Vorkommen und Bestimmung Toxinbildender Schimmelpilze der Gruppe Aspergillus flavus*. Deutsche Lebens. Rund. 63, 140-144.
- 59- **Smith, G.** (1971): *An Introduction to Industrial Mycology*. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London.
- 60- **Stubblefield, R.D., Shannon, G.M., Kollaboratörleri Demirer, M.A. et al.** (1974): *Collaborative Study of Methods for the Determination and Chemical Confirmation of Aflatoxin M₁ in Dairy Products*. J. AOAC, 57, 4. 852-857.
- 61- **Tanner, F.W.**, (1950): *Laboratory Manual and Work Book in Microbiology of Foods*. The Garrard Press. Champaign, Illinois.
- 62- **Tilden, E.B., et al** (1961): *Preparation and Properties of the Endotoxins of Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus*. Mycopath. Mycol App., 14, 325-346.
- 63- **Tolgay, Z., Tetik, İ.** (1964): *Küflerin Gıdalarda Sebep Olduğu Bozukluklar*, 422-427 "As quoted" *Muhtasar Gıda Kontrolü ve Analizleri Klavuzu*. Ege Matbaası, Ankara.
- 64- **Tolgay, Z., Demirer, M.A., Tezcan, İ., Yurtyeri, A.** (1971): *Bazı Gıdalarda Aflatoxin Araştırmaları*. TBTA 3. Bilim Kongresi Tebliği.
- 65- **Tulpule, P.G. et al.** (1964): *Effect of Feeding Aflatoxin to Young Monkeys*. The Lancet I, 962-963.
- 66- **Wilkowske, H.H., Krienke, W.A.** (1954): *Essaide Divers Fromages à Moisissures au Point de Vue de Leur Activité Antibiotique*. J. Dairy Science 1954. 10 1184-1189 "As quated" le Lait 37, 361-362, 296.
- 67- **Wiseman, H.G. et al.** (1966): *Mycotoxins. Note on Removal of Pigments from Chloroform Extracts of Aflatoxin Cultures by Use of Copper Carbonate*. AOAC, 49, 1267.
- 68- **Wiseman, H.G. et al.** (1967): *Idem* 50,982-983.