

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YL-20026-0036

BALIK YEMLERİNDE AFLATOKSİN B1, B2, G1 VE G2
DÜZEYLERİNİN SAPTANMASI

EBRU YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ferda AKAR

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
VTF-25029 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2026

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ebru YILMAZ tarafından hazırlanan “Balık Yemlerinde Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 Düzeylerinin Saptanması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05.06.2026

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Ferda AKAR Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Murat BOYACIOĞLU Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Dilek AKŞİT Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ferda AKAR'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda destek olan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Cavit KUM'a, Prof. Dr. Murat BOYACIOĞLU'na, Prof. Dr. Selim SEKKİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Hande Sultan ŞAHİNER'e, Arş. Gör. Mehmet Onur AK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmama sağladığı değerli katkılardan dolayı Öğr. Gör. Dr. Selahattin ERDOĞAN'a teşekkür ederim. Ayrıca, donanım ve olanaklarından yararlanma imkânı sunan Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi (TARBIYOMER) yönetimine, Sinop Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezine (SÜBİTAM), çalışmayı destekleyen ADÜ BAP birimine ve çalışmalarım süresince her daim yanımda olan sevgili aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Aflatoksinin Tarihsel Keşfi	2
2.2. Aflatoksin Türleri	3
2.3. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri.....	5
2.4. Aflatoksinlerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri	6
2.5. Balıklarda Aflatoksin Toksisitesi	7
2.6. Balık Yemlerindeki Aflatoksinlerin İnsanlara Etkisi	10
2.7. Balık Yemlerinde Aflatoksin İçin Yasal Limitler	10
2.8. Balık Yemlerinde Aflatoksin Mevcudiyeti ve Kontaminasyon Kaynakları.....	11
2.9. Aflatoksinler ve Aflatoksin Metabolitlerinin Tespiti ve Ölçümü.....	12
2.10. Aflatoksin Kontaminasyonunun Kontrolü	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Gereç.....	16
3.1.1. Cihazlar.....	16

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	16
3.2. Yöntem	16
3.2.1. Kuru Madde Analizi	16
3.2.2. Yemde Aflatoksin Analiz Metodu.....	17
3.2.2.1. Numune Ekstraksiyonu.....	17
3.2.2.2. İmmunoafinitif Kolonun Hazırlanması ve Uygulama Prosedürü.....	22
3.2.2.3. HPLC Analiz Koşulları	23
3.2.2.4. Standart Hazırlama.....	23
3.2.2.5. Kalibrasyon Eğrisi	24
3.2.2.6. Aflatoksin Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	30
3.2.2.7. İstatistik Analiz.....	31
4.BULGULAR.....	33
4.1. Yem Örneklerinde Kuru Madde Analizi Bulguları	33
4.2. Yem Numunelerinde Aflatoksin B1, B2, G1, G2 ve Toplam Aflatoksin Düzeylerine İlişkin Bulgular.....	36
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
BİLİMSEL ETİK BEYANI	59
ÖZ GEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFB1	: Aflatoksin B1
AFBO	: Aflatoksin B1-8,9-Epoksit
AFG1	: Aflatoksin G1
AFM1	: Aflatoksin M1
Å	: Angström
B1	: Fumonisin B1
B2	: Fumonisin B2
BHA	: Bütül Hidroksi Anisol
BHT	: Bütül Hidroksi Toluen
cps × min	: Saniye Başına Sayım × Dakika
CYP1A2	: Sitokrom P450 1A2
CYP2K1	: Sitokrom P450 2K1
CYP3A27	: Sitokrom P450 3A27
CYP3A4	: Sitokrom P450 3A4
°C	: Santigrat Derece
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DON	: Deoksinivalenol
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analiz
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FLD	: Floresans Dedektör
FPIA	: Floresan Polarizasyon İmmünolojik Testi
g	: Gram
GC	: Gaz Kromatografisi

GST	: Glutasyon S-transferaz
HNO₃	: Nitrik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAC	: İmmünoafinite Kromatografisi
İAK	: İmmünoafinite Kolonları
IR	: Kızılötesi Spektroskopisi
KBr	: Potasyum Bromür
KCl	: Potasyum Klorür
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi – Tandem Kütle Spektrometrisi
LD₅₀	: Letal Doz 50 (deneklerin %50'sini öldüren doz)
LM2	: Karaciğer Mikrozomal Enzim 2
LoD	: Tespit Sınırı
LoQ	: Tayin Sınırı
mL	: Mililitre
mg/kg	: Kilogram Başına Miligram
mm	: Milimetre
MS	: Kütle Spektrometresi
µA	: Mikroamper
µg/kg	: Kilogram Başına Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µL/L	: Mikrolitre/Litre
µm	: Mikrometre
ng/mL	: Nanogram/Mililitre
Na₂HPO₄·2H₂O	: Sodyum Fosfat Dibazik Dihidrat

NaCl	:Sodyum Klorür
NZ	: Nanoyapılı Zeolit
OTA	: Okratoksin A
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
ppb	: Milyarda Bir Parça
RT	: Alıkonma Zamanı
SD	: Standart Sapma
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
UHPLC	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UPLC–MS/MS	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
\bar{X}	: Ortalama
%	: Yüzde
%RSD	: Yüzde Bağlı Standart Sapma
<DL	: Tespit Limitinin Altında

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2'nin kimyasal yapıları.....	6
Şekil 2. Aflatoksin B1 standartları için kalibrasyon eğrisi.....	26
Şekil 3. Aflatoksin B2 standartları için kalibrasyon eğrisi.....	27
Şekil 4. Aflatoksin G1 standartları için kalibrasyon eğrisi.....	28
Şekil 5. Aflatoksin G2 standartları için kalibrasyon eğrisi.....	29
Şekil 6. Kontrol numunesi kromatogramı.....	37
Şekil 7. Analiz edilen süs balığı yemi kromatogramı (17. Örnek).....	42
Şekil 8. Analiz edilen alabalık yeminin kromatogram örneği (33. Örnek).....	43
Şekil 9. Analiz edilen çipura yeminin kromatogram örneği (39. Örnek).....	44
Şekil 10. Analiz edilen levrek yeminin kromatogram örneği (45. Örnek).....	45

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2. Ekstraktın süzüntüye bırakılması.....19
Resim 3. Ekstraktın, fosfat tamponlu salin çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra cam elyaf filtreden geçirilmesi.....20
Resim 4. Vakumlu immünoafinite kolon (IAK) sistemi ile analit saflaştırma ve elüsyon işlemi.....21
Resim 5. Elüsyon sonrası örneğin teflon filtreden geçirilerek HPLC vialine aktarılması.....22

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Aflatoksinlerin başlıca türleri.....	3
Tablo 2. Aflatoksinlerin fiziksel özellikleri.....	6
Tablo 3. Aflatoksinlerin spektral özellikleri.....	7
Tablo 4. Aflatoksin tespitinde kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları.....	13
Tablo 5. Aflatoksinlerin tutunma süreleri ve standart konsantrasyonları.....	24
Tablo 6. Aflatoksin standartları için floresan alan değerleri (cps × min).....	25
Tablo 7. Aflatoksin B1 standart konsantrasyonları ve floresan alan değerleri (cps × min).....	26
Tablo 8. Aflatoksin B2 standart konsantrasyonları ve floresan alan değerleri (cps × min).....	27
Tablo 9. Aflatoksin G1 standart konsantrasyonları ve floresan alan değerleri (cps × min).....	28
Tablo 10. Aflatoksin G2 standart konsantrasyonları ve floresan alan değerleri (cps × min).....	29
Tablo 11. Balık yemlerinde HPLC analizine göre belirlenen aflatoksin konsantrasyonları (ppb).....	30
Tablo 12. Yem örneklerinde kuru madde analizi sonuçları (%).....	33
Tablo 13. Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 için tespit sınırı (LoD) ve tayin sınırı (LoQ) değerleri (ppb).....	36
Tablo 14. TUBİTAK UME CRM RM9909 standart kontrol örneği kromatogramı.....	37
Tablo 15. Yem örneklerinin aflatoksin B1, B2, G1, G2 ve toplam aflatoksin içeriği (ppb).....	38
Tablo 16. Yem Gruplarına Göre Aflatoksin B1, B2, G1, G2 ve Toplam Aflatoksin Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması [Median (Min–Maks)].....	41

ÖZET

BALIK YEMLERİNDE AFLATOKSİN B1, B2, G1 VE G2 DÜZEYLERİNİN SAPTANMASI

Yılmaz E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2026.

Amaç: Bu çalışmanın amacı, alabalık, çipura, levrek ve süs balıkları yemlerinde aflatoksin varlığını ve düzeylerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, farklı kaynaklardan temin edilen 50 ticari balık yemi numunesinde kuru madde içeriği AOAC (1998) yöntemine, aflatoksin düzeyi ise AOAC (2003.02) yöntemine göre belirlenmiştir.

Bulgular: Yapılan analizler sonucunda, balık yemi örneklerinin kuru madde içeriğinin %91,10-%94,93 arasında değiştiği belirlenmiştir. Numunelerin %74'ünde aflatoksin B1 tespit limitinin altında bulunurken, %26'sında 0,03-11,48 ppb aralığında tespit edilmiştir. Toplam aflatoksin düzeyleri de benzer bir dağılım göstermiş; aflatoksin B2, G1 ve G2 ise çoğunlukla düşük düzeylerde veya tespit limitinin altında kalmıştır. Yem grupları arasında Aflatoksin B1, B2, G2 ve toplam aflatoksin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Buna karşın Aflatoksin G1 düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$).

Sonuç: Elde edilen sonuçlar, analiz edilen ticari balık yemlerinin mevcut aflatoksin açısından genel olarak güvenli olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksinler, akuakültür, balık yemleri, gıda güvenliği, kalite kontrol

ABSTRACT

DETERMINATION OF AFLATOXIN B1, B2, G1, AND G2 LEVELS IN COMMERCIAL FISH FEEDS

Yilmaz E. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Pharmacology and Toxicology Program, Master Thesis, Aydın, 2026.

Objective: The aim of this study was to determine the presence and levels of aflatoxin in feeds used for rainbow trout, sea bream, sea bass, and ornamental fish.

Material and Methods: In this study, the dry matter content of 50 commercial fish feed samples obtained from different sources was determined according to the AOAC (1998) method, while aflatoxin levels were analyzed using the AOAC (2003.02) method.

Results: As a result of the analyses, the dry matter content of the fish feed samples ranged between 91.10% and 94.93%. Aflatoxin B1 was below the detection limit in 74% of the samples, while it was detected in 26% at levels ranging from 0.03 to 11.48 ppb. A similar distribution was observed for total aflatoxin levels; aflatoxins B2, G1, and G2 were generally found at low levels or below the detection limit. There were statistically significant differences among the feed groups in terms of Aflatoxin B1, B2, G2, and total aflatoxin levels ($p < 0.05$). However, no statistically significant difference was detected among the groups with respect to Aflatoxin G1 levels ($p > 0.05$).

Conclusion: As a result of this study, aflatoxin contamination in fish feeds was found to be below the legal limits.

Keywords: Aflatoxins, aquaculture, fish feeds, food safety, quality control

1. GİRİŞ

Aflatoksinler, gıda, yem hammaddeleri ve hayvansal ürünleri kontamine eden küfler tarafından üretilen en güçlü doğal toksik metabolitlerdir (Schoental, 1967). Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan pamuk tohumu, yer fıstığı, mısır, soya, pirinç, kurutulmuş balık, karides ve balık unu gibi birçok yem hammaddesinin sıklıkla kontamine olduğu tespit edilmiştir (Ellis ve diğerleri, 2000; Fegan, 2005; Spring, 2005; Santacroce ve diğerleri, 2008). Günümüzde balık yetiştiriciliğinde yem formülasyonlarında bitkisel kökenli ham maddelerin kullanımının artması, bu bileşenlerin yüksek düzeyde aflatoksinle kontamine olabilmesi nedeniyle üretim sistemlerinde aflatoksikozis riskini önemli ölçüde yükseltmiştir. Bu durum, su ürünleri yetiştiriciliğinde aflatoksin kontaminasyonu sorununu daha da ciddi bir boyuta taşımıştır (Tacon ve diğerleri, 1995; Fegan, 2005; Spring, 2005; Santacroce ve diğerleri, 2008). Su ürünleri yemlerinde aflatoksin varlığı, özellikle nemli tropikal iklimlere sahip ülkelerde yaygın olarak rapor edilmektedir. Bu durum, başta küf gelişimini teşvik eden elverişli iklim koşulları ile yemlerin işlenmesi ve depolanmasında uygulanan yetersiz yöntemler olmak üzere çeşitli faktörlere bağlanmaktadır (Murjani, 2003). Akuakültürde aflatoksikoz, balıklarda vücut ağırlığının düşmesine, büyümenin yavaşlamasına ve ölüm oranlarının artmasına yol açarak üretkenliği azaltır. Aflatoksin, balık kasında ve balık ürünlerinde birikerek besin zinciri aracılığıyla insanlara geçer; bu da insanlarda kanser, genetik hasar ve bağışıklık sistemi baskılanması gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir. Balıkları ve balık yemini en çok etkileyen aflatoksin türü, Aflatoksin B1'dir. Bu nedenle, ABD Gıda ve İlaç Dairesi başta olmak üzere çeşitli kurumlar, balık yemlerinde aflatoksin için maksimum kabul edilebilir sınırı yaklaşık 20 µg/kg olarak belirlemiştir. Aflatoksinleri tespit etmek için birçok analitik ve nicel yöntem geliştirilmiş olsa da, gıda ve yemlerdeki kontaminasyonu azaltmak için hızlı ve kolay tespit yöntemleri ile birlikte iyi tarım uygulamaları, iyi üretim uygulamaları ve iyi depolama uygulamaları uygulanmalıdır. Böylece hem insan hem de hayvan sağlığı güvence altına alınabilir (Anandaraj ve diğerleri, 2025).

Bu çalışmanın amacı, ticari balık yemlerinde aflatoksin kontaminasyonunun yaygınlığını değerlendirmek ve elde edilen sonuçları yasal limitler açısından incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aflatoksinin Tarihsel Keşfi

1950'lerin sonunda İngiltere'de, Brezilya yerfıstığı unu ile beslenen 100.000 hindi, bilinmeyen bir hastalık (hindi "X" hastalığı) nedeniyle öldü; bu olayın ardından aflatoksinler keşfedildi (Blount, 1961). Etkilenen hindilerin büyük bir kısmı 4-6 haftalık yaş grubunda, geri kalanları ise 10-16 haftalık yaş grubunda yer almaktaydı. Hastalığın belirgin özelliği, hindilerin kuluçka ısıtıcısına yönelmesi, giderek güçsüzleşip yere çökmesi ve bu durumun ardından 24-48 saat içinde yaşamlarını yitirmeleriydi. Ölüm oranı değişkenlik göstermekle birlikte, %50-90 arasında seyretmekteydi (Blount, 1961).

W.P. Blount, yem toksisitesinin ve Brezilya yerfıstığı ununun hindi "X" hastalığına yol açtığını ortaya koydu; özellikle karaciğer lezyonlarını doğru biçimde tanımladı ve hastalığın enfeksiyöz kaynaklı olmadığını belirledi. Hastalık, diğer enterit ve hepatit türlerinden ayırt edilebildi. Veteriner muayeneleri genellikle olumsuz sonuç verince, hindilerin "zehirlendiği" düşüncesi ortaya çıktı. Ani ölen genç hindiler üzerinde yapılan incelemeler zehirlenmeye işaret etti, ancak herhangi bir toksik madde saptanamadı (Siller ve diğerleri, 1961; Wannop, 1961). W. P. Blount, yemlerdeki kimyasal ve toksik maddelerin hastalığa neden olmadığını göstermiş; hastalığın nedeni bulunamamış olsa da sonraki çalışmalar için temel oluşturmuştur (Blount, 1961). Yerfıstığı unu başlıca şüpheli olarak belirlendi. Brezilya yerfıstığı unu ile beslenen ördek, tavuk, sülün, sığır, fare ve domuzlarda yapılan otopsilerde karaciğerde belirgin lezyonlar gözlemlendi (Asplin ve Carnaghan, 1961; Sargeant ve diğerleri, 1961; Loosmore ve Harding, 1961; Wannop, 1963).

Hindi "X" hastalığından sorumlu toksin kristal formda izole edildi; ince tabaka kromatografisi ile mavi ve yeşil floresan gösteren iki bileşen belirlendi. Bu toksin, *Aspergillus flavus* kaynaklı aflatoksin olarak adlandırıldı ve birkaç ilişkili bileşen içerdiği saptandı. Aflatoksin keşfi ise veterinerlik, hayvan beslenmesi, toksikoloji, kimya ve mikoloji gibi farklı alanlardan birçok uzmanın katkısıyla gerçekleştirilen kolektif bir çalışmayla mümkün oldu (Pickova ve diğerleri, 1921; Van der Zijden ve diğerleri, 1962).

2.2. Aflatoksin Türleri

Toksisite ve yaygınlık açısından en önemli aflatoksinler, Tablo 1’de gösterildiği gibi AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 ve AFM1’dir. (Asao ve diğerleri, 1965; Levin, 2012; Sun ve diğerleri, 2017; Tian ve diğerleri, 2020; Zhongzhi ve Limiao, 2020; Hafez ve diğerleri, 2021; Xu ve diğerleri, 2022). Bunların yanı sıra, AFM1’e yapısal olarak benzeyen ancak daha düşük toksisiteye sahip süt kaynaklı AFM2 gibi nadir aflatoksinler de bulunmaktadır. Ayrıca, B2a ve G2a, sırasıyla AFB2 ve AFG2’nin hidroksillenmiş türevleri olup, aflatoksinlere maruz kalan hayvan ve insan idrarında saptanabilmektedir (Carvajal-Moreno, 2015).

Tablo 1. Aflatoksinlerin başlıca türleri (Mahmoud ve diğerleri, 2025).

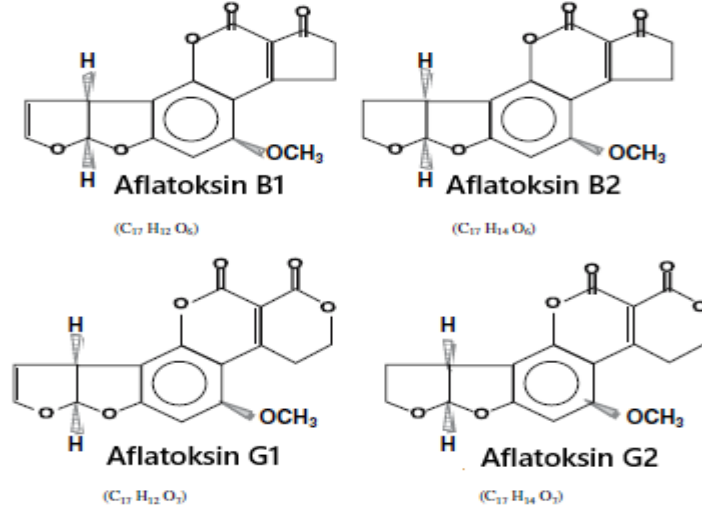
Tür	Aflatoksin B1 (AFB1)	Aflatoksin B2 (AFB2)	Aflatoksin G1 (AFG1)	Aflatoksin G2 (AFG2)	Aflatoksin M1 (AFM1)
Kimyasal yapı	AFB1, çift bağ içeren furan halkası nedeniyle yüksek reaktivite ve toksisiteye sahip bir difurankumari n yapısındadır.	AFB2, yapısal olarak AFB1’e benzer, ancak furan halkasında çift bağ bulunmadığından daha az reaktiftir.	AFG1, AFB1’e kıyasla bir lakton halkası ve ek bir metoksi grubuna sahiptir.	AFG2, AFG1’e benzer, ancak furan halkasında çift bağ bulunmamaktadır.	AFM1, AFB1’in hidroksillenmiş bir metabolitidir.
Floresans	Ultraviyole ışık altında mavi renkte floresans gösterir; bu nedenle “B” olarak	Ultraviyole ışık altında mavi renkte floresans gösterir.	Ultraviyole ışık altında yeşil floresans gösterdiğinden “G” olarak	Ultraviyole ışık altında yeşil renkte floresans gösterir.	-

	adlandırılmıştır.		adlandırılmıştır.		
Toksisite	Doğal olarak oluşan en güçlü karsinojenlerden biri olup, başlıca karaciğeri etkiler ve kronik maruziyette hepatoselüler karsinoma neden olur.	AFB2, AFB1'e kıyasla daha az toksik olmakla birlikte karaciğer hasarı ve karsinojenite riski taşır.	AFG1 yüksek derecede karsinojeniktir, ancak AFB1'e göre biraz daha düşük etkiye sahiptir.	AFG2, AFG1'e kıyasla daha az toksiktir; ancak sağlık açısından risk oluşturur ve kontamine gıdaların toplam toksik etkisini artırır.	AFM1, AFB1'e kıyasla daha düşük toksisiteye sahip olmasına rağmen, karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır.
Mevcudiyet	Mısır, yer fıstığı, pamuk tohumu ve kabuklu yemişler dahil olmak üzere çok çeşitli tarımsal ürünlerde bulunur.	Genellikle kontamine olmuş tarım ürünleri ve gıda maddelerinde AFB1 ile birlikte bulunur.	Özellikle kuruyemiş ve tahıllarda, AFB1 ile birlikte yaygın bulunur.	Özellikle sıcak ve nemli koşullarda depolanan tarım ürünlerinde AFG1 ile birlikte bulunur.	Kontamine yemle beslenen hayvanların süt ve süt ürünlerinde, ayrıca kontamine gıda tüketen annelerin sütünde bulunabilir.
Tespit	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), aflatoksinlerin varlığını belirlemek amacıyla geçmişte yaygın olarak kullanılan ilk analitik yöntemlerden biridir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), yüksek duyarlılık ve seçicilik sunan bir analiz yöntemidir.				

	<p>Enzim Bağlantılı İmmüno sorbent Testi (ELISA), kullanım kolaylığı ve hızlı sonuç elde etme özelliği nedeniyle yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir.</p> <p>Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), aflatoksin üreten küflerin genetik materyalini (DNA) doğrudan tespit etmeye olanak sağlayan bir yöntemdir.</p> <p>Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Kütle Spektrometrisi (UPLC–MS/MS), aflatoksinleri aynı anda ve çok hassas şekilde tespit etmeyi sağlayan bir yöntemdir.</p>
Kontrol	<p>Mantar gelişimini kontrol altına almak için ürün rotasyonu uygulanması, uygun sulama tekniklerinin tercih edilmesi ve hasadın zamanında gerçekleştirilmesi önemlidir.</p> <p>Ürünlerin düşük nem seviyelerinde korunabilmesi için uygun şekilde kurutulup depolanması gerekmektedir.</p> <p>Toksijenik olmayan <i>Aspergillus</i> suşları rekabet amacıyla kullanılmalı, fungusitler ise direnç gelişimi ve kalıntı riskleri göz önünde bulundurularak kontrollü biçimde uygulanmalıdır.</p>

2.3. Aflatoksinlerin Kimyasal Özellikleri

Aflatoksinler, kimyasal olarak kumarin çekirdeğine bağlı bifuran halkalarından meydana gelen polisiklik bir yapıya sahiptir. B tipi aflatoksinler yapılarında pentanon grubu bulundururken, G tipi aflatoksinler ise lakton halkası içeren bir yapısal özellik sergilemektedir (Asao ve diğerleri, 1963) (Şekil 1).



Şekil 1. AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2'nin kimyasal yapıları (Santacroce ve diğerleri, 2008).

2.4. Aflatoksinlerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Aflatoksinler B1, B2, G1 ve G2, kimyasal yapıları ve fizikokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösteren mikotoksinlerdir. Moleküler formülleri ve moleküler ağırlıkları her bir türev için özgün olup, B1 ve G1 doymamış yapıya sahipken, B2 ve G2 dihidro türevleri olarak daha doymuş bir karakter sergilerler. Bu bileşikler yüksek sıcaklıklarda erime göstermeyip termal olarak parçalanırlar. Ayrıca, tüm aflatoksinlerin özgül dönme değerleri negatif olup, optik olarak sola doğru döndürme eğilimi taşımaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Aflatoksinlerin fiziksel özellikleri (Dhanasekaran ve diğerleri, 2011).

Aflatoksin	Moleküler Formül	Moleküler Ağırlık	Erime sıcaklığı (°C)	[α] _D ²³
B1	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	312	268-269*	-559
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289*	-492
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246*	-533
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240*	-473

*Madde bu sıcaklıkta erime yerine bozunma (ayırışma) gösterir.

Aflatoksinler, ultraviyole (UV) ve kızılötesi (IR) spektrumlarında benzer davranışlar sergiler. UV ışığında absorpsiyon maksimumları 265 ve 363 m μ olarak belirlenmiştir. Floresans açısından, B1 ve B2 türevleri 425 m μ 'de, G1 ve G2 türevleri ise 450 m μ 'de ışık yayar. Ancak, bu floresansın şiddeti her türev için farklıdır; bazı aflatoksinler diğerlerine göre daha güçlü bir floresans gösterir (Tablo 3).

Tablo 3. Aflatoksinlerin spektral özellikleri (Dhanasekaran ve diğerleri, 2011).

Aflatoksin	Ultraviyole absorpsiyon (ϵ)		Kızılötesi (IR) soğurma (cm^{-1})				Floresans emisyonu (m μ)	
	265 m μ	363 m μ						
B1	13400	21800	1760	1684	1632	1598	1562	425
B2	9200	14700	1760	1685	1625	1600		425
G1	10000	16100	1760	1695	1630	1595		450
G2	11200	19300	1760	1694	1627	1597		450

2.5. Balıklarda Aflatoksin Toksikitesi

Balıklarda aflatoksikozis ilk kez Mayıs 1960'ta ABD'nin Idaho eyaletindeki gökkuşağı alabalığı kuluçkahanelerinde görülen hepatoma salgını ile rapor edilmiştir. Otopsi incelemelerinde karaciğerlerin belirgin şekilde büyümüş ve çok sayıda nodül içerdiği görülmüş, ayrıca primer hepatoselüler karsinom vakaları tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda salgının kaynağının, alabalık yemlerinde hammadde olarak kullanılan ve aflatoksin ile kontamine olmuş küflü pamuk tohumu unu olduğu belirlenmiştir. Bu olay, aflatoksinlerin karsinojenik özelliklerinin anlaşılması ve bilimsel literatürde karsinojen olarak kabul edilmesi açısından önemli bir dönüm noktası olarak değerlendirilmiştir (Ashley ve Halver, 1963). Daha sonraki yıllarda balıklarda aflatoksikozis salgınları Almanya (Wunder ve Korn, 1982), Meksika (Perez, 1984) ve Danimarka'da (Rasmussen ve diğerleri, 1985) bildirilmiştir.

Aflatoksinlerin neden olduğu hasarın şiddeti; gıda veya yemlerde bulunan toksin konsantrasyonu, maruziyet süresi ve hayvan türlerinin toksine karşı duyarlılık düzeyi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Hayvanlarda akut aflatoksin

intoksikasyonu genellikle genel sađlık durumunun bozulmasıyla karakterizedir. Bařlıca klinik bulgular arasında verim kaybı, canlı ađırlık artıřında azalma, fertilitede dūřuř ve immūn sistemin baskılanması yer almaktadır. Buna karřılık, daha yavař geliřen patolojik etkiler çođunlukla uzun sūreli maruziyet sonucunda ortaya çıkmakta olup, hem insanlarda hem de hayvanlarda genotoksik, tūmōrojenik ve teratojenik etkilerle iliřkilendirilmektedir. Benzer klinik ve patolojik bulguların, kulućkahanelerde yetiřtirilen sucul omurgalılarda da gözleendiđi bildirilmiřtir (Stewart ve Larson 2002).

Stewart ve Larson (2002), aflatoksikozisi akut, subakut ve kronik olmak üzere üç patolojik formda sınıflandırmıştır. Balıklarda akut aflatoksikozis, orta veya yüksek düzeyde aflatoksine maruz kalma sonucunda gelişir. Gökkuşağı alabalığında bu durum; anemi, soluk renkli solungaćlar, hematokrit değerlerinde dūřuř, ödem, yaygın kanamalar, besin metabolizmasında bozulma ve karaciğerde ciddi hasar ile kendini göstermektedir.

Subakut aflatoksikozis görūlen hayvanlarda genellikle orta ya da ileri derecede karaciğer hasarı gelişmektedir. Bu tabloya skleralarda sararma, mukozalarda veya deride ikterik görūnüm ve kanın pıhtılaşma mekanizmasında bozukluklar eşlik edebilmektedir. Bunun yanı sıra yemden yararlanma oranında azalma, anemi, üreme performansında bozulma, bağışıklık sisteminin baskılanması, böbrek hasarı ve erken ölümler de sık bildirilen bulgular arasında yer almaktadır (Hamilton, 1990).

Kronik aflatoksikozis, aflatoksinlerin dūřük veya orta düzeydeki dozlarına uzun süre maruz kalınması sonucunda geliřmekte olup, genellikle yavař ilerleyen ve çođu zaman fark edilmesi güć bir seyir göstermektedir. Klinik bulgular çođunlukla karaciđer fonksiyon bozukluklarıyla iliřkilidir; yemden yararlanma oranında azalma, kilo kaybı, enfeksiyonlara karřı artan duyarlılık, çeřitli organlarda hasar, tūmör oluřumu ve yükselen mortalite oranları bu bulgular arasında yer almaktadır. Bu formda özellikle aflatoksinlerin karsinojenik ve genotoksik etkileri ön plana çıkmaktadır. Nitekim, dūřük doz AFB1'e uzun süre maruz bırakılan gökkuřađı alabalıklarında karaciđer tūmörlerinin geliřtiđi rapor edilmiřtir (Pier ve diđerleri., 1980; Lovell, 1992).

Bir balık türünde aflatoksin toksisitesinin şiddeti; yař, cinsiyet, vūcut ağırlığı, beslenme şekli ve enfeksiyonlara maruz kalma gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Genç bireyler, yetişkin balıklara kıyasla genellikle daha duyarlı olup, türler arasında da aflatoksine karşı duyarlılık bakımından farklılıklar gözlenmektedir (Santacrocce ve diğerleri, 2008). Alabalıklar, AFB1'e karşı tūm balıklar içinde en duyarlı tür olup en dūřük LD₅₀ değerine

sahiptir (Ames, 1989; Santacroce ve diğeri 2008). Yemlerde 500-1.000 ppb düzeyinde AFB1 bulunması, alabalıklarda kısa süre içinde popülasyonun yaklaşık %50'sinin ölümüne neden olabilmektedir. Balıklarda AFB1'e karşı farklı duyarlılık, memelilerde olduğu gibi, AFB1'in metabolizmasında görev alan enzimlerin farklılıklarından kaynaklanır. Bu farklılıklar, genlerin farklı şekilde ifade edilmesi veya enzimlerin etkinlik seviyelerine bağlı olarak faz I ve faz II metabolizma/detoksifikasyon dengesini etkileyebilir (Bailey ve diğeri, 1988). Örneğin, gökkuşuğu alabalığında CYP2K1 (LM2) ve CYP3A27 izoenzimleri, insanlardaki CYP1A2 ve CYP3A4'e karşılık gelir ve AFB1'in epoksidasyonu ile first-pass detoksifikasyonunda önemli rol oynar (Williams ve Buhler, 1983; Lee ve diğeri, 2001).

Alabalıkta CYP2K1 enziminin AFB1'e yüksek afinitesi ve etkinliği, AFB1'in hızla toksik aflatoksin B1-epoksit (AFBO) formuna dönüşmesini kolaylaştırmakta ve böylece DNA'ya bağlanma olasılığını artırmaktadır. Alabalıklarda glutatyon S-transferaz (GST) enziminin AFBO'yu etkili bir şekilde detoksifiye edememesi, bu türün AFB1'in toksik ve kanserojen etkilerine karşı neden daha hassas olduğunu açıklar (Valsta ve diğeri., 1988; Bailey ve diğeri., 1996).

Gökkuşuğu alabalıkları, 21 gün boyunca AFB1 içeren diyetle beslenmiş ve aflatoksinlerin alımı ile atılımı incelenmiştir. AFB1, karaciğerde kas dokusuna kıyasla çok daha yüksek düzeyde birikmiştir. Başlıca metabolit olarak aflatoksikol tespit edilmiştir. Aflatoksinler hızlı bir şekilde elimine edilmiş ve kas dokusundaki AFB1 düzeyi tespit sınırının altına düşmüştür (Nomura ve diğeri, 2011).

AFB1 içeren yemlerin çipurada (*Sparus aurata*) 85 gün boyunca uygulanması sonucunda balıkların büyümesinin ciddi şekilde etkilendiği ve toplam ağırlık artışının %80 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Plazma ve karaciğerdeki karbonhidrat ve lipid metabolitlerinin azaldığı, karaciğer, böbrek ve dalakta çeşitli histopatolojik hasarların görüldüğü belirlenmiştir. Büyüme ile ilgili gen ekspresyonunda değişiklikler saptanmış; adenohipofizer büyüme hormonu ve karaciğer insülin benzeri büyüme faktörü 1 genleri ters orantılı bir ilişki göstermiştir. Stres göstergesi olan genlerin ekspresyonunun arttığı, ancak dolaşımdaki kortizol seviyelerinin etkilenmediği rapor edilmiştir. Yapılan analizlerde karaciğer ve kas dokusunda AFB1 kalıntısına rastlanmadığı da bildirilmiştir (Barany ve diğeri, 2021).

56 gün süren bir besleme denemesinde, levrek (*Lateolabrax maculatus*) 0, 0,1, 0,5 ve 1,0 mg/kg AFB1 içeren yemlerle beslenmiştir. Bulgular, AFB1 miktarı arttıkça büyüme, yem tüketimi ve kondisyon faktörlerinin azaldığını; serum ve karaciğerdeki antioksidan ve

bağışıklık göstergelerinin ise yükseldiğini göstermiştir. Ayrıca, bağırsak tripsin aktivitesi düşmüş ve bağırsak morfolojisinde hasar oluşmuştur. Deneme, 1,0 mg/kg AFB1'in levrek üzerinde toksik etkiler yarattığını ortaya koymuştur (Peng ve diğerleri, 2021).

2.6. Balık Yemlerindeki Aflatoksinlerin İnsanlara Etkisi

İnsanlarda aflatoksinlere maruziyetin başlıca kaynağı, aflatoksinle kontamine olmuş gıdaların tüketimidir. Diyetle alınan aflatoksin miktarı, özellikle gelişmekte olan ve gelişmemiş ülkelerde yüksek düzeylere ulaşabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde ortalama aflatoksin maruziyetinin, vücut ağırlığı başına günde 1,0 ng/kg'ın altında olduğu tahmin edilirken, gelişmemiş ülkelerde bu değerin 100,0 ng/kg/gün'ün üzerine çıkabildiği bildirilmektedir. Aflatoksinlere maruziyet, kontamine olmuş bitkisel gıdaların doğrudan tüketilmesi yoluyla gerçekleşebileceği gibi, mikotoksin içeren yemlerle beslenen hayvanların (örneğin balıkların) kas dokusunda biriken aflatoksin kalıntılarını içeren hayvansal proteinlerin tüketilmesi sonucunda dolaylı olarak da ortaya çıkabilmektedir (Oliveira ve Vasconcelos, 2020).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), aflatoksinleri gıdalarda kaçınılması mümkün olmayan bir kontaminant olarak değerlendirmektedir. Aflatoksin kalıntıları içeren balıkların tüketilmesi, insanlarda akut karaciğer toksisitesinden karaciğer kanseri gibi kronik hastalıklara, kanamalara, ödemlere ve hatta ani ölümlere kadar uzanan olumsuz sağlık etkilerine neden olabilmektedir (Kew, 2012; Bbosa ve diğerleri, 2013).

2.7. Balık Yemlerinde Aflatoksin İçin Yasal Limitler

Ülkemizde yemlerde istenmeyen maddelere ilişkin esaslar, 2014/11 sayılı "Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ" ile düzenlenmiştir. Buna göre balık yemlerinde aflatoksin B1 için izin verilen en yüksek limit 10 ppb (0,01 mg/kg), deoksinivalenol (DON) için 5000 ppb (5 mg/kg) ve fumonisin (B1+B2) için 10 000 ppb (10 mg/kg)'dir. Zearalenon ve okratoksin A için balık yemlerine özgü bir maksimum limit belirlenmemiştir. Bu değerler, %12 rutubet içeren yem esas alınarak tanımlanmıştır (Resmî Gazete, 2014).

2.8. Balık Yemlerinde Aflatoksin Mevcudiyeti ve Kontaminasyon Kaynakları

Balık unu, hamsi ve kapelin gibi bütün balıklardan veya menhaden, ringa ve somon gibi balıkların işlenmesi sırasında ortaya çıkan yan ürünlerden elde edilmektedir (Hardy, 1989). Balık etinin öğütülüp kurutulmasıyla elde edilen balık unu, yemlerde kullanılmak üzere besin öğeleri açısından zenginleştirilir. Ayrıca, balık yan ürünleri; hidrolizat, protein konsantresi ve benzeri yem hammaddelerinin üretiminde değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, uygun işleme ve depolama koşulları sağlanmadığında, patojenler ve mikotoksinler gıda zincirine geçebilir ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilir (Santacrocce ve diğerleri, 2008). Aflatoksinler genellikle tarlada veya depolama sırasında oluşmakla birlikte, uygunsuz depolama koşulları balık unu ve yan ürünlerinde de kontaminasyona yol açabilmektedir. Özellikle mısır, yer fıstığı ve pamuk ürünleri aflatoksin açısından yüksek risk taşımaktadır; bu nedenle, bu tür hammaddelerin balık yemlerinde kullanımı, hayvanların aflatoksin maruziyetini ve buna bağlı sağlık sorunlarını artırmaktadır (Thompson ve Henke, 2000; Guchi, 2015). Araştırmalar, yemlerdeki aflatoksin kontaminasyonunun akuakültürde hem yaygın hem de ciddi bir sorun teşkil ettiğini ve bunun birçok ülkede balık üretiminde hem ekonomik hem de sağlık açısından önemli riskler oluşturduğunu göstermektedir (Santacrocce ve diğerleri, 2008).

Aflatoksin kontaminasyonu dünya genelinde önemli bir sorundur. Balık yemlerinde aflatoksin için önerilen yasal sınır 20 µg/kg'dır (Anandaraj ve diğerleri, 2025). İran'da balık yemlerinde *Aspergillus* mantarları ve aflatoksinlerin %50'den fazla sıklıkla görüldüğü rapor edilmiştir (Fallah ve diğerleri, 2014). Özellikle gökkuşacağı alabalığı için üretilen pelet yemler ve yem bileşenlerinde aflatoksin düzeylerinin 1,83-67,35 µg/kg arasında değiştiği tespit edilmiştir (Alinezhad ve diğerleri, 2011). Benzer şekilde, Brezilya, Meksika ve Hindistan'da da balık yemlerinde aflatoksinlerin yüksek sıklıkla bulunduğu belirtilmiştir (Dutta ve Das, 2001; Barbosa ve diğerleri, 2013; Rodríguez-Cervantes ve diğerleri, 2013). Doğu Afrika'da, özellikle Kenya'nın Victoria Gölü bölgesinde balık yemlerinde aflatoksin görülme sıklığı %64,3'e kadar çıkmakta ve seviyeler 806,9 µg/kg'a ulaşmaktadır (Marijani ve diğerleri, 2017). Türkiye'deki ticari balık yemlerinin %56'sında aflatoksin konsantrasyonu 21 µg/kg'ın üzerinde bulunmuştur (Altug ve Beklevik, 2003). Mısır'da üretilen balık yemlerinde yapılan bir çalışmada ise numunelerin %40'ında ortalama 105,2 ± 1,3 µg/kg düzeyinde yüksek aflatoksin saptanmıştır (Hassan ve diğerleri, 2011). Pamuk tohumu küspesinde aflatoksin kontaminasyonu, dünya genelinde ciddi bir sorun olarak değerlendirilmektedir. Özellikle, Amerika Birleşik Devletleri'nden Avrupa pazarına ihraç edilen örneklerde, aflatoksin

içeriklerinin 200–300 mg/kg düzeyinde çok yüksek olduğu bildirilmiştir (Anthony ve diğerleri, 2012). Ayçiçeği tohumu küspesi, mısır kepeği, soya fasulyesi, pamuk tohumu küspesi ve pirinç kepeği arasında en yüksek AFB1 düzeyini (806,9 µg/kg) göstermiştir (Marijani ve diğerleri, 2017). Tanzania’da yapılan başka bir çalışmada da maksimum 662,7 µg/kg aflatoksin tespit edilmiştir (Mmongoyo ve diğerleri, 2017). Balık yemlerinde kullanılacak mısırın maksimum 135 µg/kg AFB1 ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Marijani ve diğerleri, 2017). Benzer şekilde, mısır numunelerinin %22,5’inin 20,6-135 µg/kg arasında AFB1 ile kontamine olduğu bildirilmiştir (Reddy ve Salleh, 2011). En düşük kalite mısırın hayvan yemlerinde kullanılması, hayvanları aflatoksikoz açısından daha yüksek risk altında bırakmaktadır (Mutiga ve diğerleri, 2015). Afrika ve Asya’da önemli bir temel gıda olan pirinç ve pirinç kepeği, hayvan yemlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Jayaraman ve Kalyanasundaram, 1990). Bununla birlikte, Doğu Afrika’dan temin edilen balık yemlerinde kullanılacak pirinç kepeğinin aflatoksin açısından kontamine olmadığı bildirilmiştir (Marijani ve diğerleri, 2017). Öte yandan, İran’da gerçekleştirilen bir çalışmada pirinç kepeğinin ortalama 18 µg·kg⁻¹ aflatoksin içerdiği rapor edilmiştir (Zaboli ve diğerleri, 2010). Balık yemlerinde kullanılan diğer bir tahıl ise sorgumdur. Sorgumun %28,6’sının (0,96-21,74 µg/kg) ve darı tanelerinin (105-14,96 µg/kg) aflatoksin ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Daneil ve diğerleri, 2016).

2.9. Aflatoksinler ve Aflatoksin Metabolitlerinin Tespiti ve Ölçümü

Aflatoksinlerin belirlenmesi ve miktarlarının tayini için çok sayıda analitik yöntem geliştirilmiş ve bu yöntemler zaman içerisinde sürekli olarak iyileştirilmiştir. Geleneksel ve çağdaş yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 4’de gösterilmektedir. İmmünoafinite kolon (IAC) ile temizleme sonrası HPLC analizi, aflatoksin ölçümlerinde en yaygın yöntemdir. LC–MS/MS, yakın gelecekte çoklu mikotoksin analizleri için en umut verici teknik olarak değerlendirilmektedir. Çeşitli immünolojik yöntemler, özellikle ELISA ve diğer hızlı antikor temelli testler, genellikle tarama (screening) amaçlı kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler çoğu zaman daha güvenilir ve sağlam analitik tekniklerle doğrulama analizlerini gerektirmektedir. Bunun yanı sıra, çoğunlukla immünokimyasal analizlerle birleştirilen bazı yeni gelişen teknolojiler, farklı örneklerde aflatoksinlerin hızlı analizi için önerilmektedir. Muhtemelen, hızlı örnek tarama teknikleri ile analitik yöntemleri bir araya getiren entegre bir yaklaşım, gıda ve yemlerde aflatoksinlerin tespiti açısından en uygun çözüm olacaktır.

Bir tespit yönteminin seçimi, gerçekleştirilecek aflatoksin analizinin amacına bağlıdır. Mikotoksinler ve özellikle aflatoksinler insan ve hayvan sağlığı açısından ciddi tehditler oluşturduğundan, bu konuya yönelik ilgi her zaman devam edecektir. Bunun doğal bir sonucu olarak, aflatoksinlerin tespiti ve analizine yönelik yöntemler de zaman içerisinde gelişmeyi sürdürecektir. Aynı zamanda, geliştirilen ve güncellenen yöntem ve teknolojilerin daha kullanıcı dostu olması ve daha doğru ve güvenilir sonuçlar üretmesi beklenmektedir (Mahfuz ve diğerleri, 2020).

Tablo 4. Aflatoksin tespitinde kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları (Mahfuz ve diğerleri, 2020).

Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar
GC (Gaz Kromatografisi)	Mikotoksinlerin eş zamanlı analizine olanak sağlaması, yüksek hassasiyet sunması, otomasyona uygun olması, kütle spektrometresi (MS) dedektörü ile doğrulama imkânı sağlaması	Yüksek maliyetli ekipman ve uzmanlık gereksinimi, türevlendirme zorunluluğu, matriks girişimleri, doğrusal olmayan kalibrasyon, sinyal sürüklenmesi ve carry-over etkileri ile ölçümlerde tekrarlanabilirlik sorunları
TLC (İnce Tabaka Kromatografisi)	Densitometri ile birlikte kullanıldığında güvenilir sonuçlar vermesi, HPLC'ye benzer doğruluk ve hassasiyet sağlaması, aflatoksinler için resmi yöntem olarak kabul edilmesi	Eski teknolojiye dayalı cihaz kullanımı
HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)	Yüksek hassasiyet ve seçicilik, tekrarlanabilirlik, otomasyona uygunluk, kısa analiz süresi, aflatoksinler için resmi yöntem olması	Pahalı ekipman ve uzman operatör gereksinimi, türevlendirme gerekebilir

LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi)	Çoklu mikotoksin analizi, çok düşük tespit limiti, doğrulama imkânı ve türevlendirme gerektirmemesi	Çok yüksek maliyet, ileri uzmanlık gereksinimi, iyonizasyona bağlı hassasiyet ve iç standart eksikliği
ELISA	Hızlı ve kullanımı kolay olması, düşük maliyetli ekipman gerektirmemesi, düşük tespit limiti sunması ve tarama amaçlı çoklu numune analizine uygun olması	Çapraz reaksiyon riski, yalancı pozitif/negatif sonuçlar, matriks girişimleri ve doğrulama gereksinimi
Biyosensör	Hızlı olması, temizleme gerektirmemesi, yüksek seçicilik ve düşük tespit limiti sunması, kullanım kolaylığı, düşük maliyet ve taşınabilirlik	Çapraz reaksiyon riski, katı numuneler için ekstraksiyon ve temizleme gereksinimi, tekrarlanabilirlik sorunları
FPIA (Floresan Polarizasyon İmmünolojik Testi)	Hızlı olması, temizleme gerektirmemesi, mikotoksine özgü işaretleyici kullanımı, yüksek hassasiyet ve taşınabilirlik	ELISA veya HPLC ile tutarsızlık, çapraz reaksiyon ve matriks girişimi riski ile tek seferde yalnızca bir mikotoksinin tespit edilebilmesi
Kapiler Elektroforez	Yakın yapılı mikotoksinlerin ayırımına uygun olması, yüksek hassasiyet ve immünoassaylerle birlikte çoklu analiz imkânı sağlaması	Yüksek altyapı ve karmaşık cihaz gereksinimi nedeniyle yalnızca laboratuvar ortamında kullanılabilmesi
IR (Kızılötesi) Spektroskopisi	Hızlı ve tahribatsız ölçüm, ekstraksiyon veya temizleme gerektirmemesi, kullanıcı dostu olması	Pahalı ekipman gereksinimi, kalibrasyon modelinin doğrulanması ihtiyacı, istatistik bilgisi gerektirmemesi ve düşük hassasiyet.

IAC (İmmünoafinite Kromatografisi) Florometri	+	Sıvı florometri ile kombine edilen IAC, aflatoksin tayininde LC ile karşılaştırılabilir doğruluk sunar ve resmi yöntem olarak kabul edilir	Numunenin tahrip olması, yalnızca toplam aflatoksin analizine uygun olması.
---	---	--	---

2.10. Aflatoksin Kontaminasyonunun Kontrolü

Aflatoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle kontrolü zorunludur ve bu amaçla biyolojik, kimyasal ve fiziksel stratejiler kullanılmaktadır. Biyolojik kontrolde, aflatoksin üretmeyen atoksijenik suşlar ile bazı bakteri ve mantar izolatları kullanılarak tarla koşullarında aflatoksin oluşumu azaltılmaktadır (Shabeer ve diğerleri, 2022). Kimyasal kontrol kapsamında, sitrik asit, laktik asit, tartarik asit, propiyonik asit ve hidroklorik asit gibi organik ve inorganik asitler aflatoksinleri azaltmada etkilidir. En yüksek inhibisyon ise sitrik asitte (%86-92) ve laktik asitte (%67) görülmektedir. Sodyum bisülfid ve sodyum hidrosülfid, uygulama yöntemi ve işlem sıcaklığına bağlı olarak farklı düzeylerde aflatoksin kontrolü sağlamaktadır. Özellikle sodyum hidrosülfid, aflatoksin miktarını %96-100 oranında azaltabilmektedir. Ayrıca bazı tuzlar, alkali bileşikler, ozon ve kitosan nanoparçacıkları aflatoksin seviyelerini düşürür (Sipos ve diğerleri, 2021). Antioksidanlar, gıda ve yemlerde oksidatif bozulmayı önleyen katkı maddeleridir. Bu grupta yaygın olarak kullanılan BHA (bütil hidroksi anisol), BHT (bütil hidroksi toluen) ve propilparaben, sadece oksidasyonu engellemekle kalmaz, aynı zamanda aflatoksin oluşumunu ve toksik etkilerini azaltmada da etkili olabilir (Yin ve diğerleri, 2008). Bir diğer kimyasal yöntem adsorbanlardır. Kil, bentonit, zeolit, aktif karbon ve maya türevleri gibi adsorbanlar broyler yemlerine eklenerek aflatoksinleri bağlar, kana karışmasını önler ve vücuttan atılmasını sağlar (Tahir ve diğerleri, 2018; Sipos ve diğerleri, 2021). Nanoyapılı zeolit (NZ), aflatoksinleri bağlayarak toksisitesini azaltır ve üretici mikroorganizmaların etkisini sınırlayarak aflatoksin kontaminasyonunun kontrolüne katkı sağlar (Nikawa ve diğerleri, 1997). Aflatoksin kontaminasyonunu kontrol etmek için mekanik ayırma, ısı ile işlem, ultraviyole veya iyonlaştırıcı radyasyon ve yoğunluk ayırımı gibi yöntemler kullanılabilir (Samarajeewa ve diğerleri, 1990; Yin ve diğerleri, 2008). Soğuk plazma ve gama ışını gibi termal olmayan yöntemler de aflatoksin seviyelerini önemli ölçüde düşürür (Sipos ve diğerleri, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Çalışma kapsamında, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi (TARBİYOMER)'nde bulunan hassas terazi (Kern), etiv (Selecta) ve desikatör kullanıldı. Ayrıca aflatoksin analizi için hizmet alımı gerçekleştirildi ve Sinop Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (SÜBİTAM)'nde bulunan Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC; Thermo Scientific Ultimate 3000, ABD) ile analizler yapıldı. Kullanılan detektör FLD olup, yardımcı modül olarak Kobra Cell tercih edildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aflatoksin tayini için aseton (Supelco), saf su, metanol (Carlo Erba), ve PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4; Tuzlu ~0.01 M Fosfat Tamponu) hazırlanmasında 0,2 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Scharlau), 1,45 g sodyum fosfat dibazik dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Scharlau), 0,2 g potasyum klorür (KCl) (Scharlau), ve 8 g sodyum klorür (NaCl) (Scharlau), kullanılmıştır. Kullanılan standart LGC B-MYC0300-1 'dir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kuru Madde Analizi

Analiz için darası alınan petrilere 5 g tartılan örnekler 105 °C'de ağırlıkları sabit kalana kadar etüvde kurutulmuştur. Kuru madde yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (AOAC 1998).

$$\text{Nem (\%)} = (\text{Kuru örnek} + \text{dara ağırlığı (g)} - \text{İlk örnek ağırlığı (g)}) / \text{Başlangıç örnek ağırlığı (g)} \times 100$$

$$\text{Kuru madde (\%)} = 100 - \text{Nem}$$

3.2.2. Yemde Aflatoksin Analiz Metodu

Bu çalışmada hayvan yemlerinde aflatoksin tayini, AOAC 2003.02 metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Araştırma kapsamında toplam 50 adet balık yemi numunesi analiz edilmiştir. Çalışmada kullanılan yem örnekleri farklı kaynaklardan temin edilmiştir. Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) yetiştiriciliğinde kullanılan ticari balık yemleri çeşitli balık yetiştiriciliği işletmelerinden sağlanmıştır. Süs balıklarına yönelik ticari yem örnekleri ise farklı akvaryumculardan ve internet üzerinden satış yapan tedarikçilerden temin edilmiştir. Elde edilen yem numuneleri, analiz aşamasına kadar uygun depolama koşullarında muhafaza edilerek çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Ayrıca, her bir numunenin orijinal ambalajında yer alan içerik, miktar, son kullanma tarihi ve üretici firma gibi bilgiler detaylı şekilde incelenmiş ve kayıt altına alınmıştır. Numunelerin aflatoksin analizleri, Sinop Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (SÜBİTAM) laboratuvarlarında hizmet alımı kapsamında gerçekleştirilmiştir.

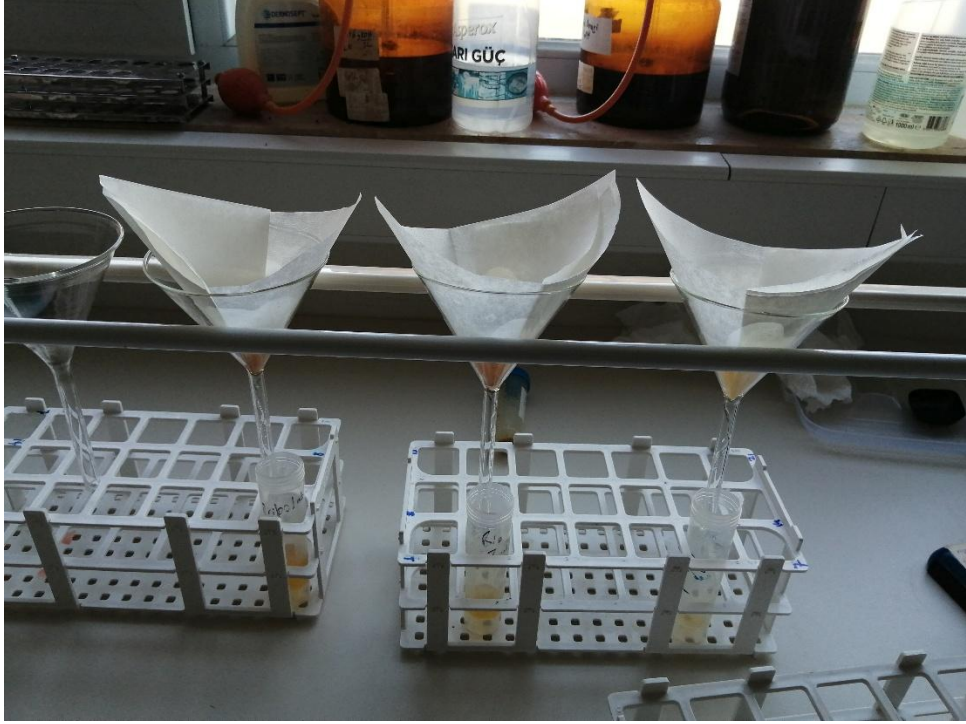
3.2.2.1. Numune Ekstraksiyonu

Yem numunelerinin analizlerinin gerçekleştirilebilmesi ve tam homojenizasyonun sağlanabilmesi amacıyla her bir numuneden en az 50 gram örnek alınmıştır. Balık yemi numuneleri analiz öncesinde homojenizasyon amacıyla mutfak tipi elektrikli kahve öğütücüsü (Bosch TSM6A014R) kullanılarak öğütülmüştür (Resim, 1). Homojenize edilen numuneden 50 g tartılarak 500 mL hacimli bir erlene aktarılmıştır. Numune üzerine 250 mL aseton:su (85:15, v/v) karışımı ilave edilmiştir. Karışım blenderda homojenize edildikten sonra ultrasonik banyoda tutulmuş ve ardından santrifüj edilmiştir. Bu aşamada uygulanan seyreltme faktörü $250 \text{ mL}/50 \text{ g} = 5$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen ekstrakt, huniye yerleştirilen katlı filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüş ve filtrat temiz bir beher içerisine toplanmıştır (Resim, 2). Filtrattan 5 mL alınarak üzerine 95 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ilave edilmiş ve karışım cam elyaf filtreden geçirilmiştir. Bu aşamadaki seyreltme faktörü $100 \text{ mL}/5 \text{ mL} = 20$ olarak

belirlenmiştir (Resim, 3). İmmünoafinite kolonuna yükleme yapılırken, kolondan geçen 0,5 g yem eşdeğeri ekstrakt içindeki aseton/asetonitril oranının %5'i geçmemesine dikkat edilmiştir. Bu nedenle çözücünün seyreltilmesi, $M_1V_1 = M_2V_2$ bağıntısına göre hesaplanmıştır. %85 aseton içeren ekstraktan 5 mL alınarak toplam hacim 100 mL'ye tamamlandığında, son aseton konsantrasyonu %4,25 olarak bulunmuş ve kolon yüklemesi için uygun kabul edilmiştir.



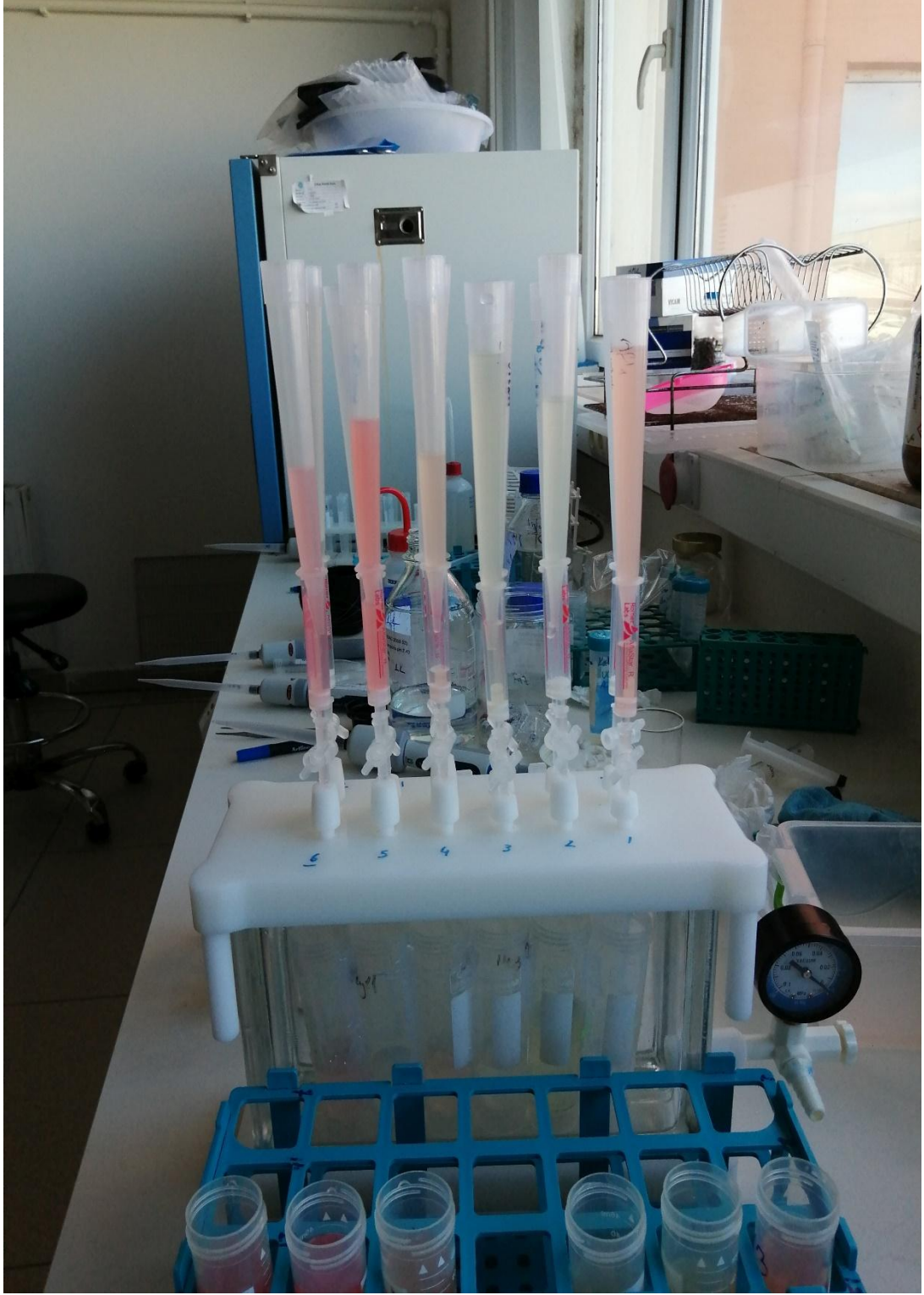
Resim 1. Örneğin öğütülmesi.



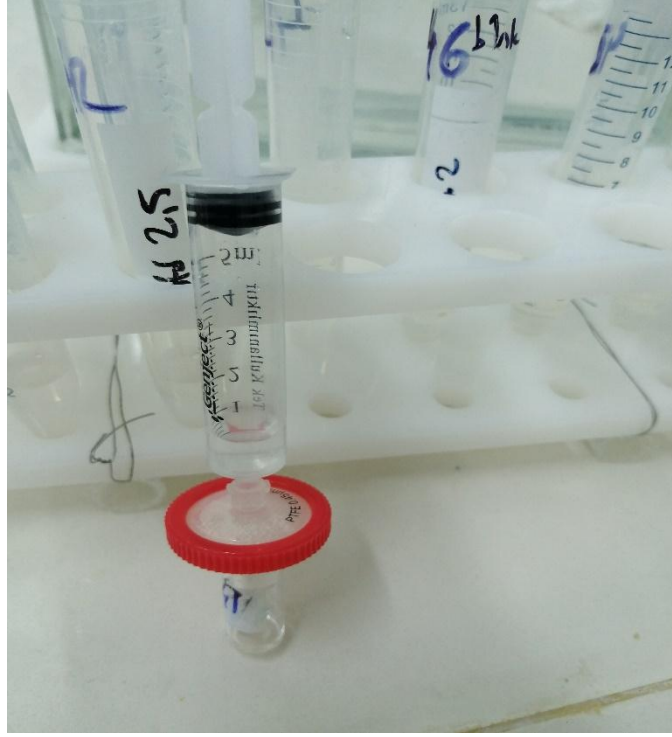
Resim 2. Ekstraktın süzünüye bırakılması.



Resim 3. Ekstraktın, fosfat tamponlu salin çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra cam elyaf filtreden geçirilmesi.



Resim 4. Vakumlu immünoafinite kolon (IAK) sistemi ile analit saflaştırma ve elüsyon işlemi.



Resim 5. Elüsyon sonrası örneğin teflon filtreden geçirilerek HPLC vialine aktarılması.

3.2.2.2. İmmunoafinitif Kolonun Hazırlanması ve Uygulama Prosedürü

12 portlu vakum manifoldu (Biocomma SPEMF12G-E) üzerine sabitlenmiş immunoafinite kolonu (Romer, AflaStar™ R IAC 3 ml, COIAC1504-10001966) öncelikle şartlandırılmıştır. Şartlandırma için kolona, fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi saniyede bir damla (3 mL/dakika) hızında toplam 10 mL uygulanmıştır. Ardından, 50 mL filtrat-PBS karışımı kolondan geçirilerek aflatoksinlerin kolona bağlanması sağlanmıştır. Kolondaki istenmeyen maddeleri temizlemek amacıyla üzerine 20 mL saf su uygulanmış ve kolon ardından hava ile kurutulmuştur. Bu aşamaya kadar kolondan geçen tüm çözeltiler bertaraf edilmiştir (Resim, 4). Elüsyon için kolondan 2 mL mobil faz geçirilmiş ve küçük bir falkona alınmıştır. Falkonun içeriği daha sonra 0,45 µm teflon filtreden geçirilerek HPLC vialine aktarılmıştır (Resim, 5). Elüsyon aşamasında, klasik prosedürlerde uygulanan 1 mL metanol ve 1 mL su kullanımının yapılmamasının gerekçesi tartışma bölümünde açıklanmıştır. Bu aşamadaki seyreltme faktörü 2/50 olarak kaydedilmiştir. Toplam seyreltme faktörü ise $5 \times 20 \times (2/50) = 4$ olarak hesaplanmıştır (Stroka ve diğerleri, 2003).

3.2.2.3. HPLC Analiz Koşulları

LC-MS/MS cihazlarının ilk yatırım, bakım, sarf ve işletme maliyetlerinin yüksek olması; ayrıca cihazın sürdürülebilir kullanımının uzman personel, sürekli teknik destek ve yüksek işletme altyapısı gerektirmesi nedeniyle, il gıda kontrol laboratuvarları da dahil olmak üzere birçok rutin analiz laboratuvarında daha uygulanabilir ve ekonomik bir yöntem olan HPLC sistemleri tercih edilmektedir. Bu nedenle çalışmada analizlerin yaygın erişilebilirliği, sürdürülebilirliği ve rutin laboratuvar koşullarına uygunluğu dikkate alınarak HPLC yöntemi kullanılmıştır. Aflatoksin analizi, Thermo Scientific Ultimate 3000 HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon floresans dedektör (FLD) ile yapılmış ve elektrokimyasal türevlendirme amacıyla Kobra Cell sistemi, 9V ve 100 μ A akımda çalıştırılmıştır. Kromatografik ayırma, Troyasil 100 C18 kolonu (250 \times 4,6 mm, 5 μ m tanecik boyutu, 110 Å gözenek çapı) kullanılarak sağlanmıştır. Otomatik örnekleyici sıcaklığı 15 °C, kolon sıcaklığı ise 40 °C olarak ayarlanmıştır. Mobil faz; 550 mL saf su, 180 mL asetonitril ve 270 mL metanol karışımına 0,119 g KBr ve 93 μ L %68'lik HNO₃ ilave edilerek hazırlanmış ve pH değeri 2,88 olacak şekilde ayarlanmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dak olarak sabit tutulmuştur. Standart çözeltiler, 1:1 (v/v) metanol karışımı kullanılarak hazırlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 100 μ L olarak belirlenmiş ve sistem basıncı yaklaşık 120 bar olacak şekilde sabitlenmiştir. Floresans dedektör koşulları; Aflatoksin B1 ve G1 için uyarılma/emisyon dalga boyları 362/425 nm, Aflatoksin G2 ve G2 için 362/455 nm olarak ayarlanmış, tüm aflatoksinlerin birlikte değerlendirilmesinde ise 360/440 nm dalga boyları kullanılmıştır. Analiz sırasında aflatoksinlerin kolon çıkış sırası G2, G1, B2 ve B1 şeklinde gerçekleşmiş olup, toplam analiz süresi 18 dakika olarak belirlenmiştir. Analizler, laboratuvar sıcaklığı 18-28 °C ve bağıl nemi %20–80 aralığında olan koşullarda yürütülmüştür.

3.2.2.4. Standart Hazırlama

Bu çalışmada aflatoksin standart çözeltilerinin hazırlanmasında LGC B-MYC0300-1 aflatoksin standardı kullanılmıştır. Ana standart çözeltisi aflatoksin G2, G1, B2 ve B1'i sırasıyla 0,503 ppm, 2,01 ppm, 0,50 ppm ve 2,01 ppm konsantrasyonlarında içermekte olup, toplam aflatoksin konsantrasyonu 5,023 ppm'dir. Toplam aflatoksin içerisindeki bileşen oranları G2 için 0,10, G1 için 0,40, B2 için 0,10 ve B1 için 0,40 olarak belirlenmiştir. Ana stok çözeltisinin

konsantrasyonu 5023 ppb olup, 100 ppb konsantrasyonunda ara stok elde etmek amacıyla ana stoktan 0,10 mL alınarak 10 mL hacimli falcon tüpe aktarılmış ve üzerine 4,90 mL 1:1 (v/v) metanol:su karışımı eklenmiştir. Elde edilen 100 ppb ara stok çözeltisinden, farklı hacimlerde alikotlar alınarak son hacmi 10 mL olacak şekilde 1:1 (v/v) metanol:su ile tamamlanmış ve 0,5; 1; 2; 5; 6; 8 ve 10 ppb toplam aflatoksin konsantrasyonlarına sahip çalışma standartları hazırlanmıştır. Cihaz yazılımına girilen bireysel aflatoksin konsantrasyonları, toplam konsantrasyon ve bileşen oranları dikkate alınarak hesaplanmıştır. Aflatoksin G2 ve B2 için 0,05-1,00 ppb, aflatoksin G1 ve B1 için ise 0,20-4,00 ppb aralığı kullanılmıştır. Metot doğrulama çalışmalarında, toplam aflatoksin konsantrasyonları 0,5; 1; 2; 5; 6; 8 ve 10 ppb olarak belirlenmiştir.

3.2.2.5. Kalibrasyon Eğrisi

Yedi noktalı kalibrasyon eğrisi kullanılarak standart çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir aflatoksin için standart konsantrasyonlar ve HPLC alıkonma zamanları (RT) aşağıda verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Aflatoksinlerin tutunma süreleri ve standart konsantrasyonları.

Aflatoksin	RT (min)	Standart konsantrasyonlar (ppb)
G2	7.801	0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8, 1
G1	9.585	0.2, 0.4, 0.8, 2, 2.4, 3.2, 4
B2	11.843	0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8, 1
B1	14.893	0.2, 0.4, 0.8, 2, 2.4, 3.2, 4
Toplam	-	0.5, 1, 2, 5, 6, 8, 10

Kalibrasyon eğrilerinden elde edilen floresan alan değerleri (cps × min) aşağıda verilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Aflatoksin standartları için floresan alan değerleri (cps × min).

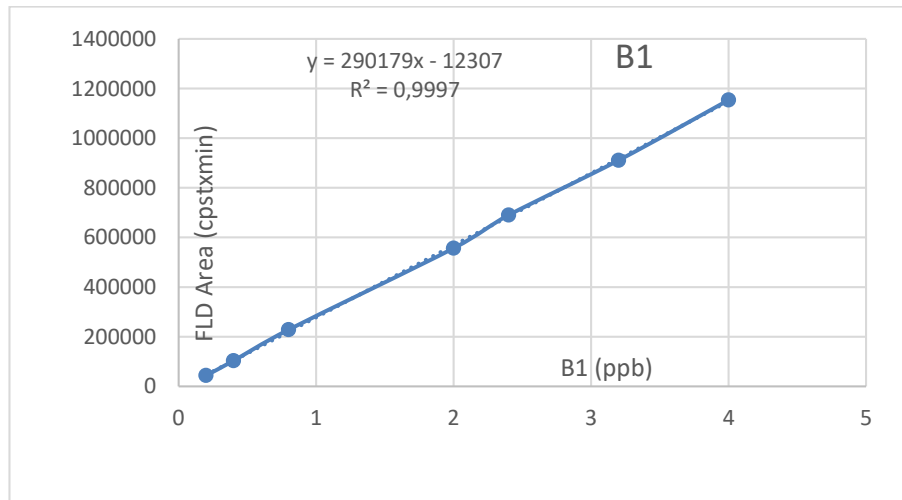
Standart	G2 (cps×min)	G1 (cps×min)	B2 (cps×min)	B1 (cps×min)
std1	11,665	37,961	22,718	43,862
std2	28,170	945,84	49,457	103,298
std3	61,328	206,545	107,993	228,313
std4	153,431	501,058	265,435	556,488
std5	188,767	609,847	328,759	689,887
std6	251,447	812,121	432,656	910,716
std7	318,793	1.025,624	547,457	1.153,620

Tablo 7’de, Aflatoksin B1 için farklı standart konsantrasyonlara karşılık elde edilen floresan alan değerleri (cps × min) verilmiştir.

Tablo 7. Aflatoksin B1 standart konsantrasyonları ve floresan alan değerleri (cps × min).

Aflatoksin B1 (ppb)	FLD (cps × min)
0.2	43,862
0.4	103,298
0.8	228,313
2	556,488
2.4	689,887
3.2	910,716
4	1.153,620

Şekil 2’de, Aflatoksin B1 standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir. Standart konsantrasyonlar ile floresan alan değerleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir.



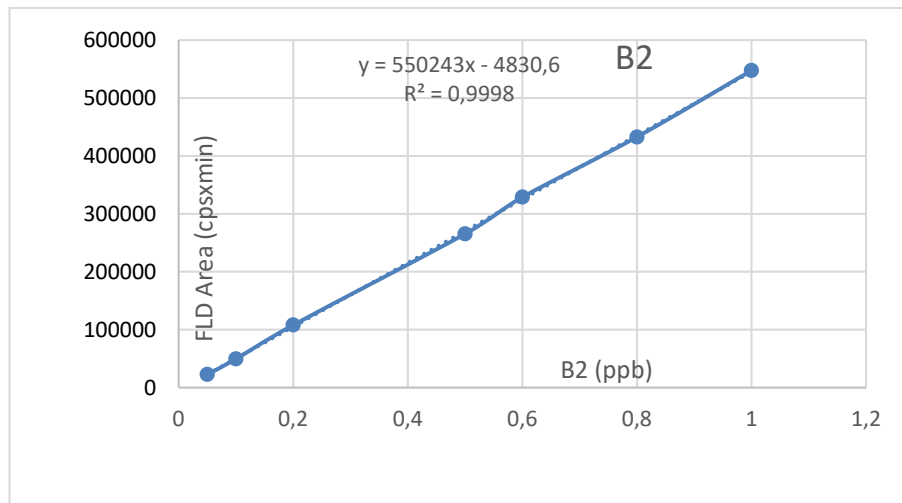
Şekil 2. Aflatoksin B1 standartları için kalibrasyon eğrisi.

Tablo 8’de, Aflatoksin B2 için farklı standart konsantrasyonlara karşılık elde edilen floresan alan değerleri (cps × min) sunulmuştur.

Tablo 8. Aflatoksin B2 standart konsantrasyonları ve floresan alan değerleri (cps × min).

Aflatoksin B2 (ppb)	FLD (cps × min)
0.05	2,2718
0.1	49,457
0.2	107,993
0.5	265,435
0.6	328,759
0.8	432,656
1	547,457

Şekil 3’de, Aflatoksin B2 standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir. Standart konsantrasyonlar ile floresan alan değerleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir.



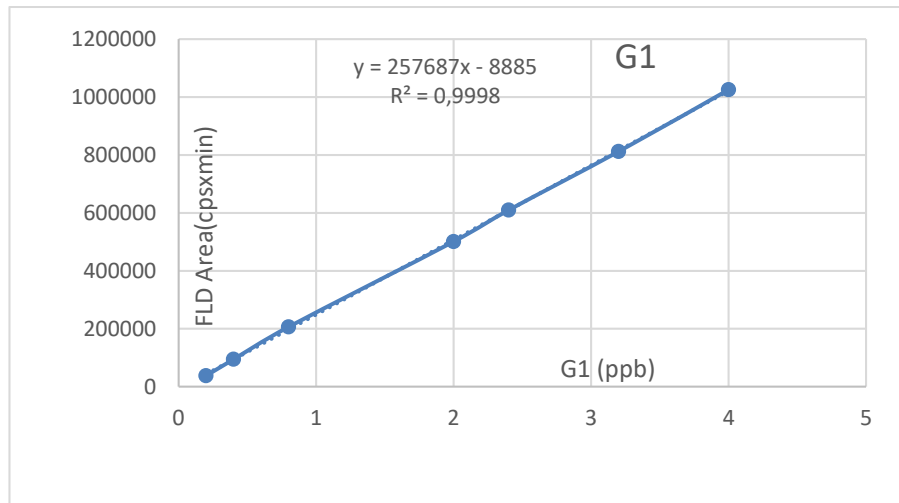
Şekil 3. Aflatoksin B2 standartları için kalibrasyon eğrisi.

Tablo 9’da, Aflatoksin G1 için farklı standart konsantrasyonlara karşılık elde edilen floresan alan değerleri (cps × min) sunulmuştur.

Tablo 9. Aflatoksin G1 standart konsantrasyonları ve floresan alan değerleri (cps × min).

Aflatoksin G1 (ppb)	FLD (cps × min)
0.2	37,961
0.4	94,584
0.8	206,545
2	501,058
2.4	609,847
3.2	812,121
4	1.025,624

Şekil 4’te, Aflatoksin G1 standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir. Standart konsantrasyonlar ile floresan alan değerleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir.



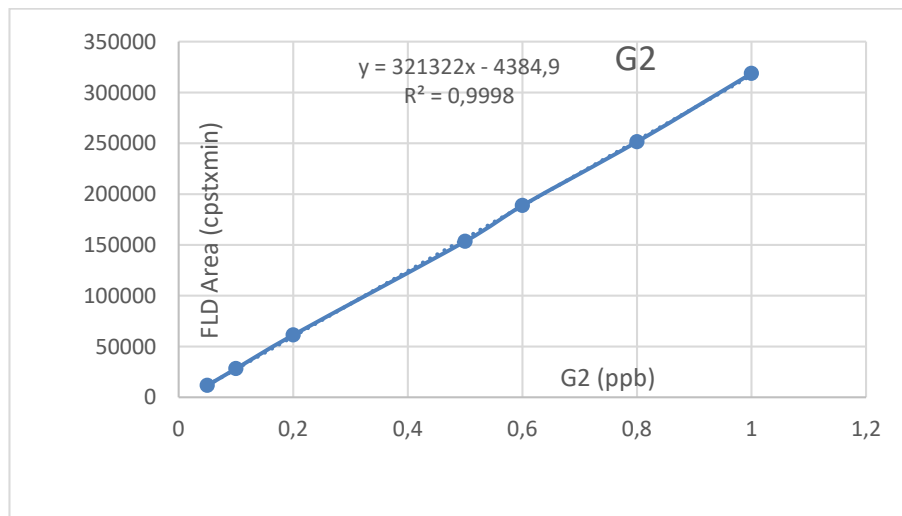
Şekil 4. Aflatoksin G1 standartları için kalibrasyon eğrisi.

Tablo 10’da, Aflatoksin G2 için farklı standart konsantrasyonlara karşılık elde edilen floresan alan değerleri (cps × min) sunulmuştur.

Tablo 10. Aflatoksin G2 standart konsantrasyonları ve floresan alan değerleri (cps × min).

Aflatoksin G2 (ppb)	FLD (cps × min)
0.05	11,665
0.1	28,170
0.2	61,328
0.5	153,431
0.6	188,767
0.8	251,447
1	318,793

Şekil 5’te, Aflatoksin G2 standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir.



Şekil 5. Aflatoksin G2 standartları için kalibrasyon eğrisi.

Tablo 11’de, balık yemlerinde HPLC ile ölçülen aflatoksin konsantrasyonları (ppb) verilmiştir. Alan değerleri ile konsantrasyonlar arasında doğrusal ilişki olup, matematiksel eşitlikler kullanılarak seyreltme faktörü dikkate alınarak gerçek aflatoksin miktarları hesaplanmıştır.

Tablo 11. Balık yemlerinde HPLC analizine göre belirlenen aflatoksin konsantrasyonları (ppb).

Sonuç (ppb)	Eşitlik
B1	$((\text{Numunenin B1Alanı}+12307)/290179)\times 4$
G1	$((\text{Numunenin G1Alanı}+8885)/257687)\times 4$
B2	$((\text{Numunenin B2Alanı}+4830)/550243)\times 4$
G2	$((\text{Numunenin G2Alanı}+4384)/321322)\times 4$

*Eşitliklerdeki çarpan 4, seyreltme faktörünü temsil etmektedir.

3.2.2.6. Aflatoksin Konsantrasyonunun Hesaplanması

Test numunesindeki aflatoksin konsantrasyonu, kalibre edilmiş standart çözeltilerden elde edilen deneysel veriler kullanılarak hesaplanmıştır. Bu kapsamda, farklı konsantrasyonlara sahip aflatoksin standart çözeltilerine ait pik alanı değerleri (x eksen, birim) ile bu değerlere karşılık gelen aflatoksin konsantrasyonları (y eksen, ng/mL) tablo hâlinde düzenlenmiştir. Elde edilen veriler doğrusal regresyon analizine tabi tutulmuş ve buna bağlı olarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Doğrusal kalibrasyon eğrisi aşağıdaki denklem ile tanımlanmıştır:

$$y = a \cdot x + b$$

Burada;

y, aflatoksin konsantrasyonunu (ng/mL),

x, dedektör sinyalini (pik alanı),

a, doğrusal regresyon doğrusunun eğimini,

b, doğrusunun y-eksenini kestiği noktayı ifade etmektedir.

Analiz edilen ölçüm çözeltisinden elde edilen pik alanı değeri, kalibrasyon denkleminde x yerine yazılarak ölçüm çözeltisindeki aflatoksin konsantrasyonu hesaplanmıştır. Hesaplanan ölçüm çözeltisi konsantrasyonundan yola çıkılarak test numunesinin aflatoksin kontaminasyonu (ng/g) aşağıdaki parametreler dikkate alınarak belirlenmiştir:

Wt (g): Analiz için kullanılan test numunesi miktarı

Solvent (mL): Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücü hacmi

Aliquot (mL): İmmünoafinite kolonu (IAC) temizleme işlemine alınan ekstrakt hacmi

Elüsyon (mL): IAC elüsyonu sonrası elde edilen nihai çözelti hacmi

C hesap (ng/mL): Doğrusal regresyon kullanılarak hesaplanan aflatoksin konsantrasyonu

Numunenin aflatoksin kontaminasyonu aşağıdaki genel eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Kontaminasyon (ng/g)} = \frac{C_{\text{hesap}} \times \text{Elüsyon (mL)} \times \text{Solvent (mL)}}{\text{Aliquot (mL)} \times Wt \text{ (g)}}$$

Heksan veya sikloheksan kullanılan izolasyon prosedürlerinde, ekstraksiyon sırasında eklenen bu solventlerin hacimleri hesaplamaya dâhil edilmemiştir.

Toplam aflatoksin kütle fraksiyonu, her bir aflatoksin türü (AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂) için ayrı ayrı hesaplanan kontaminasyon değerlerinin toplanmasıyla elde edilmiştir:

$$\text{Toplam Aflatoksin (ng/g)} = \text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$$

Bu yaklaşım ile test numunesinin toplam aflatoksin içeriği nicel olarak belirlenmiştir (AOAC, 2003.02)

3.2.2.7. İstatistik Analiz

Veriler normal dağılım göstermediği ve çok sayıda sıfır değeri içerdiği için gruplar arasındaki karşılaştırmalarda Kruskal–Wallis testi kullanılmıştır. Anlamlı farklılık saptanan parametrelerde ikili karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann–Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar medyan (minimum–maksimum) olarak sunulmuş olup, farklı üst

simge harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$). İstatistiksel analizler, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde IBM SPSS Statistics 21 kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Logan, 2010).

4. BULGULAR

4.1. Yem Örneklerinde Kuru Madde Analizi Bulguları

Çalışmada analiz edilen yem örneklerinin kuru madde içerikleri Tablo 12’de verilmiştir. Her örnek için üçlü ölçümler (n=3) alınmış ve sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak sunulmuştur.

Tablo 12. Yem örneklerinde kuru madde analizi sonuçları (%).

Numune No	Kuru Madde ($\bar{X} \pm SD$)
(Cyprinidae-sazangiller)	
1	92,22 \pm 1,19
2	91,90 \pm 1,19
3	91,28 \pm 1,18
4	91,81 \pm 1,19
5	91,22 \pm 1,18
6	93,80 \pm 1,21
7	91,18 \pm 1,18
8	91,80 \pm 1,19
9	91,86 \pm 1,19
10	91,67 \pm 1,18
11	92,37 \pm 1,19
12	92,45 \pm 1,19
13	92,59 \pm 1,20
14	91,10 \pm 1,18
Canlı Doğuranlar	

15	93,84±1,21
16	92,27±1,19
17	91,25±1,18
18	94,93±1,23
19	92,58±1,20
20	93,60±1,21
21	91,42±1,18
22	91,97±1,16
Cichlid	
23	91,87±1,19
24	91,53±1,18
25	92,83±1,20
26	92,49±1,19
27	92,68±1,20
28	92,25±1,19
29	92,37±1,19
30	91,98±1,19
Labirentliler	
31	91,84±1,19
Kedi Balıkları	
32	91,62±1,18
Alabalık (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	
33	91,37±1,18
34	91,85±1,19
35	91,59±1,18

36	91,82±1,19
37	91,86±1,19
38	91,46±1,18
<i>Çipura (Sparus aurata)</i>	
39	91,86±1,19
40	91,52±1,18
41	91,13±1,18
42	91,96±1,19
43	91,25±1,18
44	91,10±1,18
<i>Levrek (Dicentrarchus labrax)</i>	
45	91,86±1,19
46	91,67±1,18
47	91,28±1,18
48	91,18±1,18
49	91,42±1,18
50	91,83±1,19

*Analizler üç tekrarlı (n=3) olarak gerçekleştirilmiştir. \bar{X} : Aritmetik ortalama, SD: Standart sapma

Tablo 12'ye göre yem örneklerinde yapılan kuru madde analiz sonuçları incelendiğinde, tüm örneklerin %91,10 ile %94,93 arasında değişen kuru madde içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, nem içeriklerinin %5,07 ile %8,90 aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

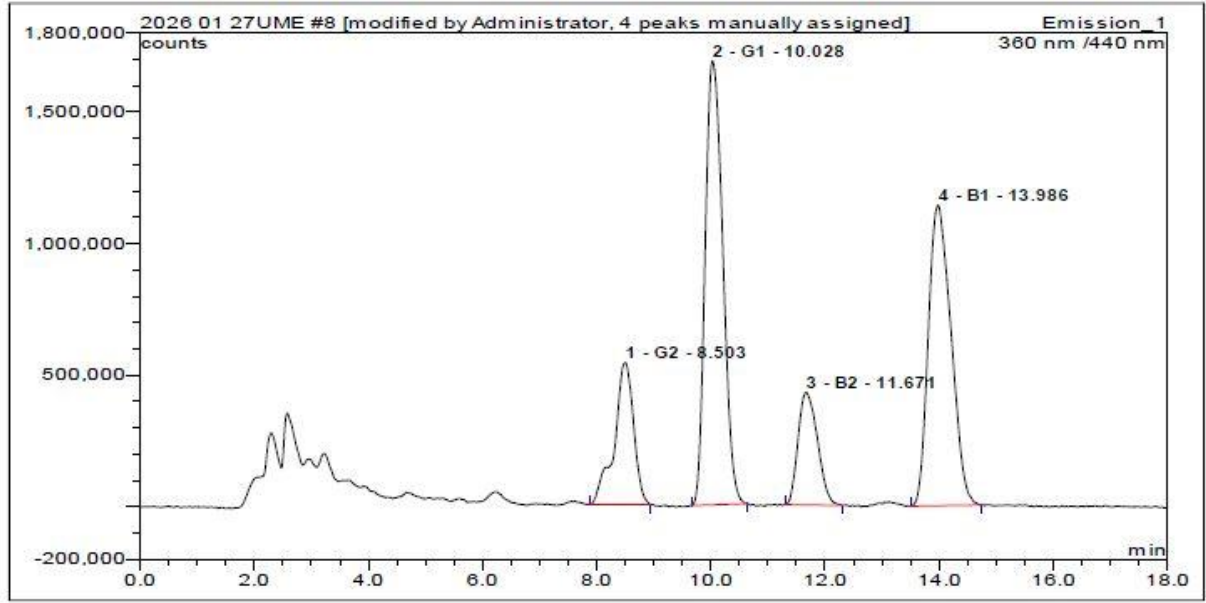
4.2. Yem Numunelerinde Aflatoksin B1, B2, G1, G2 ve Toplam Aflatoksin Düzeylerine İlişkin Bulgular

Araştırma süresince 50 adet yem numunesi analiz edilmiştir. Yöntemin duyarlılığını göstermek için tespit sınırı (LoD) ve tayin sınırı (LoQ) belirlenmiştir. LoD, analitin saptanabildiği en düşük konsantrasyonu; LoQ ise güvenilir şekilde miktarının ölçülebildiği en düşük düzeyi ifade eder (Tablo 13).

Tablo 13. Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 için tespit sınırı (LoD) ve tayin sınırı (LoQ) değerleri (ppb).

Aflatoksin	LoD (ppb)	LoQ (ppb)
B1	0,0016	0,0053
B2	0,0010	0,0034
G1	0,0019	0,0063
G2	0,0015	0,0051

Şekil 6, kontrol numunesine ait kromatogramı göstermektedir. Kontrol numunesi, analiz prosedürünün doğruluğunu ve yöntemin güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla referans olarak alınmıştır.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height counts	Area counts*min	Rel.Area %	Amount
1	8.50	G2	539753.000	211828.931	14.04	1.030
2	10.03	G1	1687056.000	602378.486	39.94	4.098
3	11.67	B2	427543.000	168923.537	11.20	0.625
4	13.99	B1	1141762.000	525198.971	34.82	3.050
Total:			3796114.000	1508329.925	100.00	8.803

Şekil 6. Kontrol numunesi kromatogramı.

Ölçümlerin doğruluğu ve geri kazanım (%recovery) hesaplamalarında CRM (Sertifikalı Referans Malzeme) olarak kullanılan TÜBİTAK UME RM 9909 kontrol numunesi ile analizler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre aflatoxin B1 için geri kazanım %96,2, B2 için %94,7, G1 için %95,5 ve G2 için %96,3 olarak tespit edilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14. TUBİTAK UME CRM RM9909 standart kontrol örneği kromatogramı.

Atanmış Değer (µg/kg)	Ölçülen Değer (µg/kg)	Hata (%)	Doğruluk (%)	Kazanım (%)
1.07	1.03	3.74	96.26	96.26
4.29	4.10	4.48	95.52	95.52
0.66	0.63	5.30	94.70	94.70
3.17	3.05	3.79	96.21	96.21

Tablo 15. Yem örneklerinin aflatoksin B1, B2, G1, G2 ve toplam aflatoksin içeriği (ppb).

Numune No	B1 (X̄)	RSD (%)	B2 (X̄)	RSD (%)	G1 (X̄)	RSD (%)	G2 (X̄)	RSD (%)	Toplam Aflatoksin	RSD (%)
1	1,11	6,63	0,08	6,68	<DL	<DL	<DL	<DL	1,19	6,633
2	1,07	8,68	0,07	9,62	<DL	<DL	<DL	<DL	1,14	8,438
3	0,16	7,16	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,16	7,160
4	2,37	2,65	0,21	3,12	<DL	<DL	<DL	<DL	2,58	2,655
5	4,70	2,81	0,41	2,10	<DL	<DL	<DL	<DL	5,11	2,752
6	0,22	5,38	0,02	2,75	<DL	<DL	<DL	<DL	0,25	4,615
7	0,08	6,68	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,08	6,681
8	2,39	5,60	0,30	6,65	<DL	<DL	<DL	<DL	2,69	5,689
9	4,09	5,80	0,37	6,47	<DL	<DL	<DL	<DL	4,46	5,855
10	4,24	1,22	0,40	2,49	0,26	1,84	<DL	<DL	4,91	1,143
11	0,15	8,50	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,15	8,499
12	0,74	8,84	0,06	3,17	0,07	5,47	<DL	<DL	0,87	7,961
13	0,08	9,16	0,02	3,74	<DL	<DL	<DL	<DL	0,10	6,881
14	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,00	0,00
15	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,05	8,32	0,05	8,316
16	<DL	<DL	0,44	1,97	<DL	<DL	0,35	4,97	0,78	1,741
17	10,40	5,90	1,08	8,42	<DL	<DL	<DL	<DL	11,48	5,893

18	0,11	6,78	0,02	3,88	0,05	7,84	0,04	5,46	0,22	2,959
19	7,54	9,96	0,65	9,04	<DL	<DL	<DL	<DL	8,19	9,884
20	3,90	0,58	0,38	1,28	<DL	<DL	<DL	<DL	4,27	0,590
21	1,88	9,51	0,20	9,74	<DL	<DL	<DL	<DL	2,08	9,467
22	0,03	7,64	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,03	7,640
23	1,19	5,18	0,13	2,22	0,16	7,07	0,02	3,66	1,51	4,952
24	0,19	8,56	0,03	11,23	<DL	<DL	<DL	<DL	0,21	7,795
25	0,38	4,94	0,03	0,36	0,09	4,76	0,05	9,12	0,56	5,036
26	0,80	6,86	0,09	7,99	<DL	<DL	0,03	5,87	0,91	4,857
27	1,07	9,83	0,09	6,87	0,06	8,06	<DL	<DL	1,22	9,158
28	0,33	5,56	0,05	8,45	<DL	<DL	0,08	3,06	0,46	3,048
29	1,37	7,97	0,12	11,61	0,05	7,94	<DL	<DL	1,54	7,996
30	0,03	6,81	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,03	6,807
31	4,53	7,55	0,44	8,14	<DL	<DL	<DL	<DL	4,97	7,589
32	<DL	<DL	0,02	5,76	<DL	<DL	0,15	5,68	0,17	4,733
33	0,16	4,43	<DL	<DL	0,13	0,59	<DL	<DL	0,28	6,662
34	0,42	7,45	0,07	8,88	<DL	<DL	<DL	<DL	0,50	7,615
35	0,32	5,79	0,07	1,93	<DL	<DL	<DL	<DL	0,39	4,632
36	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,49	6,76	0,49	6,756

37	0,37	5,12	0,07	1,06	0,05	1,72	0,02	1,46	0,49	10,858
38	0,49	6,06	0,05	9,41	0,03	3,03	<DL	<DL	0,57	6,039
39	0,14	8,56	<DL	<DL	<DL	<DL	2,68	4,14	2,82	4,028
40	0,21	7,52	0,02	2,35	<DL	<DL	1,82	6,92	2,05	6,096
41	0,05	6,46	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,05	6,459
42	0,06	8,07	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,06	8,072
43	0,09	1,36	<DL	<DL	<DL	<DL	2,04	8,53	2,13	8,123
44	0,09	4,56	<DL	<DL	<DL	<DL	1,86	6,59	1,95	6,115
45	0,32	6,38	0,05	6,25	0,05	9,57	1,62	9,78	2,04	8,946
46	0,21	8,63	0,04	3,76	0,02	8,60	0,02	1,44	0,29	6,878
47	0,04	3,98	<DL	<DL	<DL	<DL	0,04	8,31	0,08	1,801
48	0,06	4,55	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0,06	4,554
49	0,03	1,47	<DL	<DL	<DL	<DL	0,78	4,92	0,82	4,696
50	0,11	3,74	<DL	<DL	<DL	<DL	3,23	3,22	3,35	3,125

*Analizler üç tekrarlı (n=3) olarak gerçekleştirilmiştir. B1: Aflatoksin B1 (ortalama değer); B2: Aflatoksin B2 (ortalama değer); G1: Aflatoksin G1 (ortalama değer); G2: Aflatoksin G2 (ortalama değer); Toplam Aflatoksin: B1+B2+G1+G2 toplamı; \bar{X} : Aritmetik ortalama; %RSD: Yüzde Bağıl Standart Sapma; <DL: Tespit limitinin altında

Yapılan analizler sonucunda, 50 numunenin %74'ünde aflatoksin B1 tespit limitinin altında bulunmuştur. Kalan 13 numunede (%26) aflatoksin B1 tespit edilmiş olup, düzeyler 0,03–11,48 ppb arasında değişmektedir. Toplam aflatoksin içeriği açısından da benzer bir dağılım gözlenmiş; 37 numune tespit limitinin altında, 13 numune ise 0,03–11,48 ppb arasında

değişen düzeylerde aflatoksin içermektedir. Aflatoksin B2, G1 ve G2 ise genellikle düşük seviyelerde bulunmuş ve birçok numunede tespit limitinin altında kalmıştır (Tablo 15).

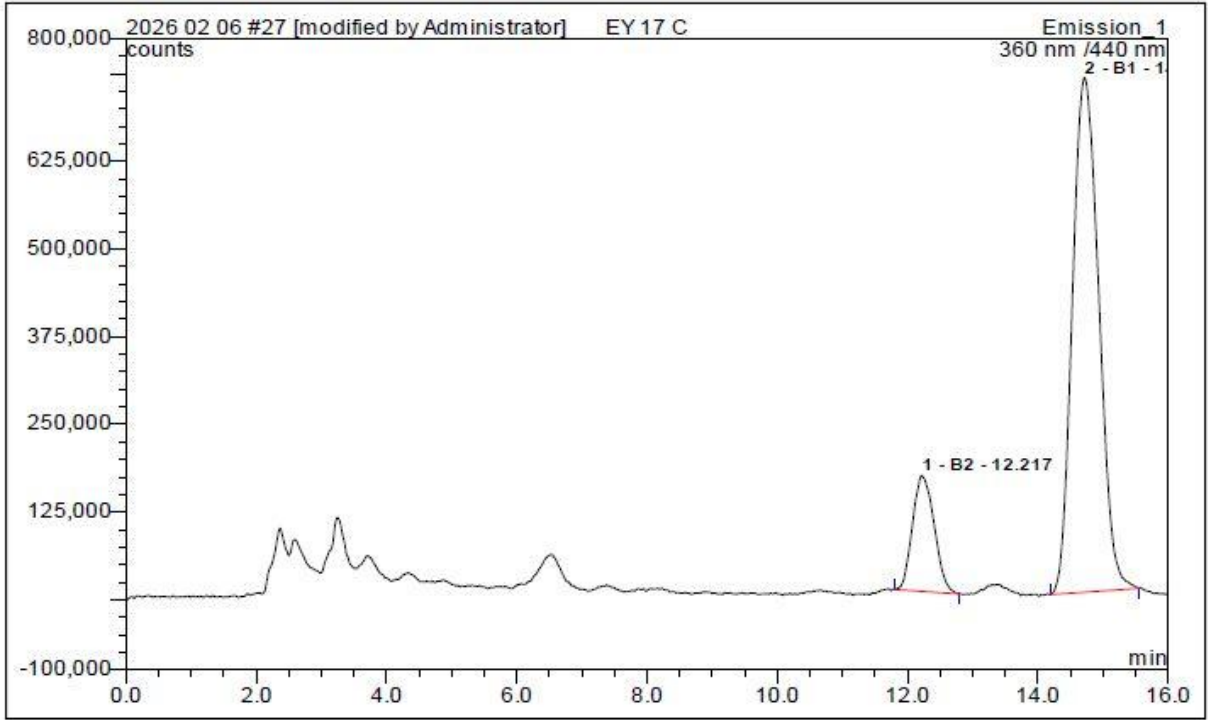
Tablo 16. Yem Gruplarına Göre Aflatoksin B1, B2, G1, G2 ve Toplam Aflatoksin Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması [Median (Min-Maks)].

Yem Grupları	Örnek Sayısı (n)	Aflatoksin B1 [Median (Min-Max)]	Aflatoksin B2 [Median (Min-Max)]	Aflatoksin G1 [Median (Min-Max)]	Aflatoksin G2 [Median (Min-Max)]	Toplam Aflatoksin [Median (Min-Max)]
Grup 1	96	0,77 (0,00-10,99) ^a	0,07 (0,00-1,16) ^a	0,00 (0,00-0,27) ^a	0,00 (0,00-1,15) ^b	1,22 (0,00-12,07) ^a
Grup 2	18	0,35 (0,00-0,51) ^b	0,07 (0,00-0,08) ^a	0,00 (0,00-0,06) ^a	0,00 (0,00-2,51) ^b	2,50 (0,26-2,60) ^b
Grup 3	18	0,09 (0,05-0,22) ^c	0,00 (0,00-0,02) ^c	0,00 (0,00-0,03) ^a	1,89 (0,00-2,80) ^a	1,92 (0,05-2,95) ^c
Grup 4	18	0,09 (0,03-0,33) ^c	0,00 (0,00-0,06) ^b	0,00 (0,00-0,11) ^a	0,04 (0,00-4,81) ^a	0,53 (0,06-3,47) ^d

Not: Grup 1: Süs balığı yemleri; Grup 2: Alabalık yemleri; Grup 3: Çipura yemleri; Grup 4: Levrek yemleri. ^{abcd} Farklı üst simge harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).

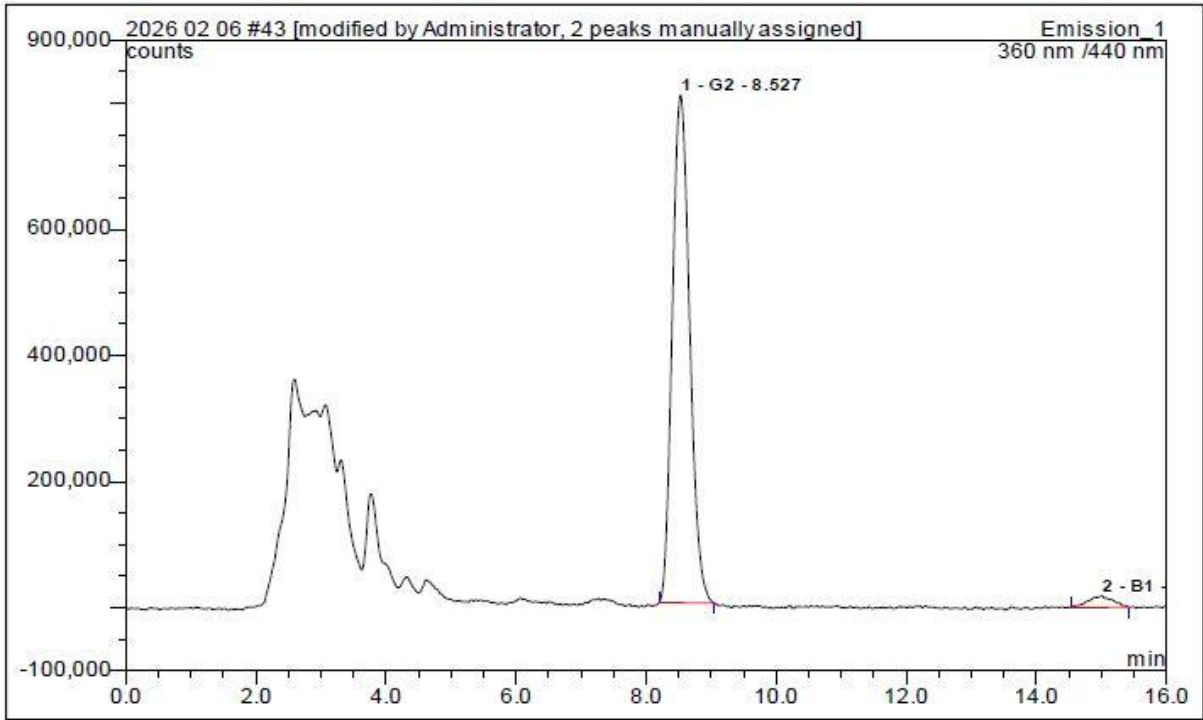
Yem grupları arasında Aflatoksin B1, B2, G2 ve toplam aflatoksin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna karşın Aflatoksin G1 düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 16).

Aşağıda farklı konsantrasyonlardaki aflatoksin standartlarının balık yemleri örneklerine ilave edilmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları gösterilmiştir (Şekil 7-10).



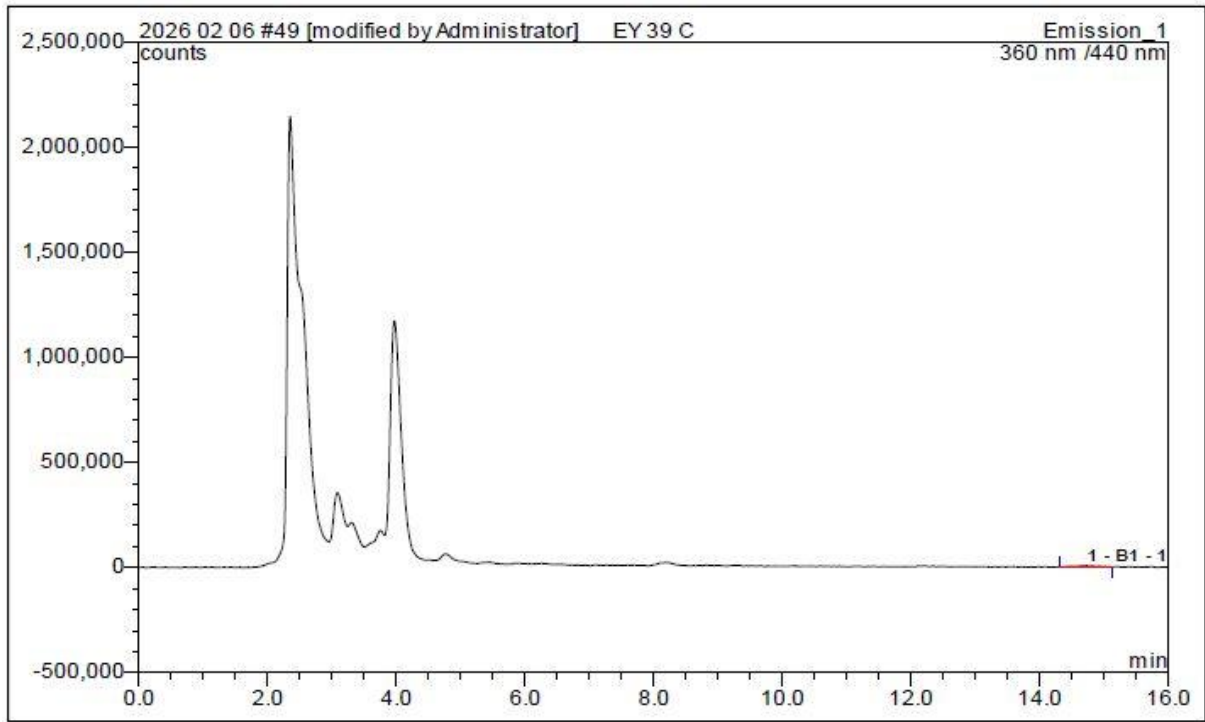
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height counts	Area counts*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	12.22	B2	165218.000	63804.763	15.63	0.472	BMB
2	14.72	B1	733068.000	344357.550	84.37	4.852	BMB
Total:			898286.000	408162.313	100.00	5.325	

Şekil 7. Analiz edilen süs balığı yemi kromatogramı (17. Örnek).



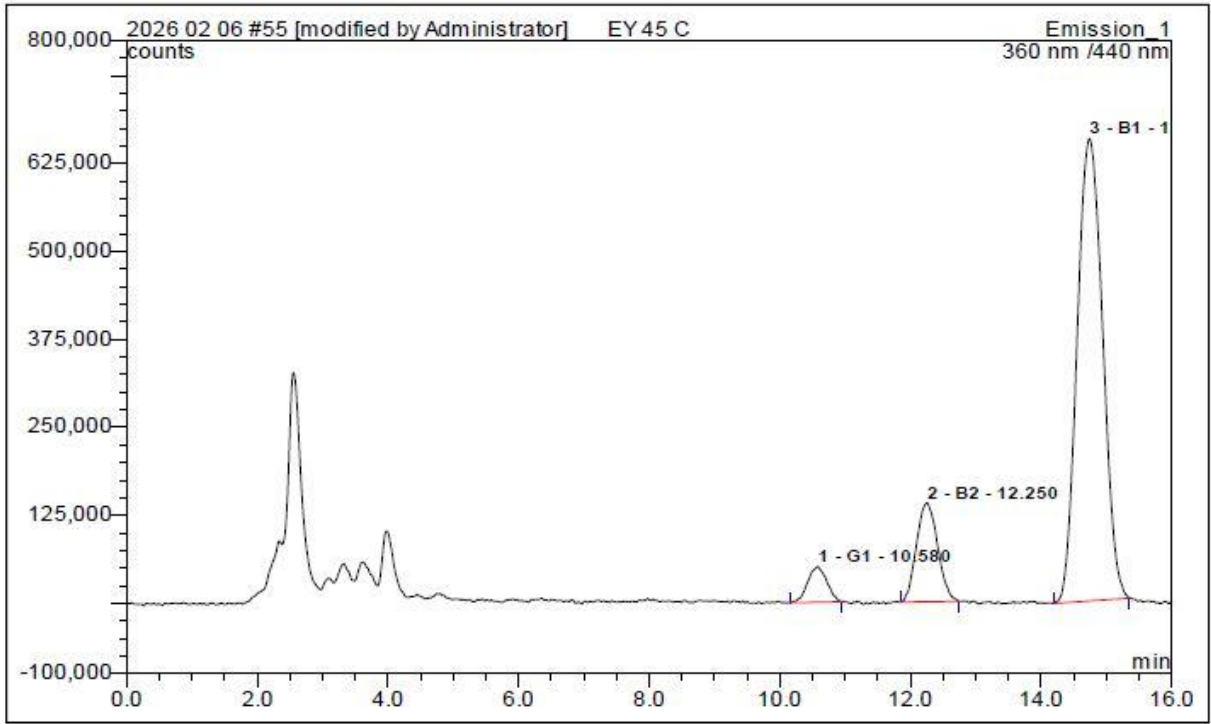
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height counts	Area counts*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	8.53	G2	805092.000	248332.243	96.83	3.180	BMB ^{^^}
2	15.01	B1	18177.000	8130.153	3.17	0.115	BMB ^{^^}
Total:			823269.000	256462.397	100.00	3.295	

Şekil 8. Analiz edilen alabalık yeminin kromatogram örneği (33. Örnek).



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height counts	Area counts*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	14.73	B1	6947.000	2646.787	100.00	0.037	BMB*
Total:			6947.000	2646.787	100.00	0.037	

Şekil 9. Analiz edilen çipura yeminin kromatogram örneği (39. Örnek).



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height counts	Area counts*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	10.58	G1	50650.000	17054.672	4.65	0.270	BMB
2	12.25	B2	140548.000	52756.817	14.39	0.391	BMB
3	14.74	B1	657054.000	296884.470	80.96	4.183	BMB
Total:			848252.000	366695.958	100.00	4.844	

Şekil 10. Analiz edilen levrek yeminin kromatogram örneği (45. Örnek).

5. TARTIŞMA

Birçok ülkede balık yemlerinde aflatoksin düzeyi üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Türkiye’de de benzer çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışma ise alabalık, çipura, levrek ve süs balığı yemlerinin birlikte değerlendirildiği ve yerli üretim HPLC kolonu kullanılan ilk çalışma olması açısından özgündür. Analiz sonuçlarına göre, aflatoksin düzeylerinin mevzuatta belirtilen üst sınırları aşmadığı saptanmıştır.

İmmünoafinite kolon (IAC) kullanılarak gerçekleştirilen aflatoksin analizlerinde literatürde sıklıkla elüsyon basamağı için 1 mL metanol ve ardından 1 mL su kullanımı önerilmektedir (AOAC, 2003; AOAC, 1999). Bu yöntem, metanolün antikor–aflatoksin etkileşimini zayıflatmasıyla analitlerin kolondan ayrılmasını sağlar. Ardından su eklenerek mobil faz koşullarına uygun bir ortam oluşturulur. Ancak uygulamada, %50 metanol içeren bu elüsyon koşullarının bazı durumlarda antikor–aflatoksin bağını tamamen kırmakta yetersiz kalabildiği ve buna bağlı olarak geri kazanımın düştüğü veya kromatografik sinyal elde edilemediği gözlemlenebilmektedir. Özellikle düşük konsantrasyon seviyelerinde bu durum pik oluşmaması ya da zayıf pik şiddeti şeklinde ortaya çıkabilmektedir.

Sübitam tarafından geliştirilen yöntemde, mobil faz kompozisyonu %55 su, %18 asetonitril ve %27 metanol olacak şekilde hazırlanmış; ortama 93 µL/L HNO₃ ilave edilerek pH 2,8’e ayarlanmıştır. Bu asidik koşullar altında gerçekleştirilen elüsyon işleminin daha etkin sonuçlar verdiği görülmüştür. Düşük pH koşulları, antikor ile aflatoksin arasındaki hidrojen bağlarını ve zayıf elektrostatik etkileşimleri bozarak analitin kolondan tamamen ayrılmasını sağlar. Ayrıca metanol ve asetonitrilin birlikte bulunduğu organik faz karışımı, aflatoksinlerin çözünürlüğünü artırmakta ve elüsyon verimini yükseltmektedir. Elüsyon çözeltisinin mobil faz ile aynı bileşime sahip olması, enjeksiyon sırasında çözücü uyumsuzluğunu önler, pik şeklinin bozulmasını engeller ve daha kararlı tutunma süreleri elde edilmesini sağlar. Bu nedenle, CRM kontrol numunesinde doğru sonuçların elde edilmesi, uygulanan elüsyon koşullarının analitik açıdan uygun ve yeterli olduğunu göstermektedir.

Mobil faz hazırlanırken çözücülerin karıştırılma sırası, fazın homojenliği ve sistemin kararlı çalışması açısından önemlidir. Bu çalışmada mobil faz hazırlanırken önce su ve

asetonitril karıştırılmış ve elde edilen karışım ultrasonik banyoda en az beş dakika bekletilmiştir. Ultrasonik işlem sırasında oluşan yoğun kabarcık çıkışı sona erdikten sonra karışıma metanol eklenmiş ve ultrasonik işleme beş dakika daha devam edilmiştir. Son aşamada ise çözeltiliye nitrik asit ilave edilerek pH değeri 2.5–3 aralığına ayarlanmıştır. Bu sıralama, mobil fazın homojenliğini sağlamak ve çözeltide oluşabilecek istenmeyen fiziksel değişimleri önlemek amacıyla uygulanmıştır.

Buna karşılık, metanol ve su önce karıştırılıp ardından asetonitril eklendiğinde çözeltide kısmi beyaz kolloidal oluşum ve giderilemeyen kabarcıklar gözlenmiştir. Bu durum mobil fazın tam olarak homojenleşmesini geciktirebilmekte ve sistemde kararsızlığa neden olabilmektedir. Bu nedenle mobil faz hazırlanırken çözücülerin eklenme sırasına dikkat edilmesi, analizlerin tekrarlanabilirliği ve kromatografik performans açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada dikkat çeken bir diğer husus, immünoafinite kolonlarının (İAK) hacminin analitik performans üzerindeki etkisidir. 3 mL hacimli İAK kartuşlarının aflatoksinleri etkin şekilde tuttuğu görülmüştür; ancak bu kartuşların 1 mL kartuşlara kıyasla daha fazla antikor içermesi, bazı HPLC sistemlerinde kullanılan C18 kolonlarda ayırım performansını olumsuz etkileyebilmektedir. Yüksek antikor kapasitesi nedeniyle, aflatoksin–antikor etkileşimleri elüsyon sonrasında tam olarak ayrıştırılamamakta ve bu durum kromatografik sinyal davranışına yansımaktadır.

Aynı numunenin aynı 3 mL İAK kartuşundan ikinci kez geçirilmesi durumunda daha yüksek sinyal elde edilmesi, bu durumu doğrulamaktadır. İlk kullanımda kartuştaki yüksek antikor miktarının aflatoksini kısmen maskeleyerek analitin solvent pikinin hemen arkasında düzensiz bir sinyal oluşmasına yol açtığı düşünülmektedir. Buna karşılık, 1 mL hacimli İAK kartuşlarında böyle bir sinyal kayması veya maskeleyme etkisi gözlenmemiştir. Bu bulgular, İAK kartuş hacminin ve antikor kapasitesinin kullanılan kolon boyutu ve sistem parametreleriyle uyumlu seçilmesinin, doğru pik ayırımı ve güvenilir kantifikasyon açısından kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, aflatoksin analizinde literatürde yaygın olarak kullanılan ithal C18 kolonlara alternatif olarak, yerli üretim (Troyasil) ters faz C18 kolonu kullanılmıştır. Söz konusu kolon, mevcut USP eşdeğerlik tablolarında yer almamakla birlikte, benzer faz özelliklerine sahip olması nedeniyle yöntem geliştirme ve validasyon çalışmalarına dahil

edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, yerli üretim bir HPLC kolonunun aflatoksin analizinde etkin şekilde kullanılabilmesini göstermektedir. Bu yönüyle çalışma, yerli kolon kullanılarak gerçekleştirilen ilk aflatoksin analizi olması açısından önem taşımaktadır. Kullanılan kolon, küresel morfolojide ve yüksek saflıkta (<10 ppm metal içeriği) silika bazlı dolgu materyaline sahip olup, 110 Å gözenek çapı, 300 m²/g yüzey alanı ve 0,8 mL/g gözenek hacmi ile karakterizedir. Partikül boyutları 1,8-10 µm aralığında değişmekte (opsiyonel olarak 4 ve 7 µm), sabit faz ise monomerik ve uç grupları kapatılmış yapı göstererek %15 karbon yükü içermektedir.

Balık yemlerinde aflatoksin kontaminasyonunun yem türüne bağlı olarak farklılık gösterebildiği, özellikle B1, B2 ve G2 aflatoksinlerinin dağılımında belirgin değişimler bulunduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, yem hammaddelerinin ve üretim koşullarının aflatoksin profili üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada en yüksek toplam aflatoksin değeri, 17 numaralı yem örneğinde 11,48 ppb olarak tespit edilmiştir. Bu değer, toplam aflatoksin için belirlenen 20 ppb sınırının altında kalmakla birlikte dikkatle izlenmesi gereken bir düzeydir. Aynı örnekte aflatoksin B1 (AFB1) düzeyi 10,40 ppb olarak belirlenmiş olup, Yemlerde İstenmeyen Maddelere İlişkin Tebliğ (Tebliğ No: 2014/11) kapsamında AFB1 için belirlenen maksimum sınır olan 10 ppb'ye oldukça yakın olduğu görülmüştür. Bu durum, yemlerin uzun süreli kullanımı ve kronik maruziyet açısından potansiyel risk oluşturabileceğini göstermektedir (Shabeer ve diğerleri, 2022). Benzer şekilde 19 numaralı yem örneğinde toplam aflatoksin düzeyi 8,19 ppb, 5 numaralı yem örneğinde ise 5,11 ppb olarak belirlenmiştir. Bu değerler yasal sınırların altında olmakla birlikte, özellikle akvaryum balık yemlerinde tahıl ve bitkisel içerik oranının yüksek olması nedeniyle kontaminasyon riskinin daha belirgin olabileceğini göstermektedir (Oliveira ve Vasconcelos, 2020).

Kaymak (2001), Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan toplam 59 alabalık yemi örneğinden %49,1'inde aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 toplamını 0,48–3,46 ppb aralığında tespit etmiş; hiçbir örneğin yasal limitleri aşmadığını bildirmiştir. Ayrıca nemlendirilen yemlerin 28 °C'de 20 gün bekletilmesiyle aflatoksin üretiminin gerçekleştiğini göstermiştir. Altuğ ve Beklevik (2003), 1998–2000 yıllarında balık üretim işletmeleri, yem fabrikaları ve yurtdışı kaynaklı yemlerden elde ettikleri 85 örnekte aflatoksin düzeylerini incelemiştir. Analizlerde, 20 örnekte 21,2–42,4 ppb, 22 örnekte 5–20 ppb aralığında total aflatoksin bulunurken, 43

örnekte aflatoksin tespit edilmemiştir. 20 ppb'nin üzerindeki örneklerde total aflatoksinin büyük çoğunluğunu Aflatoksin B1 oluşturmuştur. Ayrıca, balık üretim işletmelerinden alınan yemlerde aflatoksin düzeyleri fabrika ve yurtdışı kaynaklı yemlere göre daha yüksek bulunmuştur. Aktüre (2005), Adana ve çevresindeki alabalık çiftliklerinde kullanılan 33 yem örneğini HPLC ile analiz etmiş; 8 örnekte Aflatoksin B1 tespit edilmiş ancak hiçbir örnek Türkiye'de belirlenen limitleri aşmamıştır. Yaroğlugül ve Gül (2007), Erzurum'daki yavru alabalık yemlerinde aflatoksin B1 düzeylerini incelemiş, Ağustos ayında en yüksek, Ekim ve Aralık'ta daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Artış, yüksek nemle ilişkili olmasına rağmen 20 ppb'nin altında kalmıştır. Merako (2010), Trakya'daki alabalık çiftliklerinde kullanılan üç ticari yemde aflatoksin düzeylerini HPLC ile incelemiştir. Yapılan analizlerde tüm örneklerde aflatoksin değerleri tespit edilebilir sınırın altında bulunmuştur. Türkiye'nin farklı bölgelerindeki balık yemleri üzerinde yapılan çalışmalar, analiz edilen örneklerin ülkemizde belirlenen aflatoksin limitlerini aşmadığını göstermektedir. Bu sonuç, yem üretiminde kullanılan hammaddelerin özenle seçilmesi, üretim ve depolama koşullarının uygun şekilde sağlanması ile düzenli denetimlerin uygulanması sayesinde aflatoksin riskinin büyük ölçüde kontrol altında tutulduğunu ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada yapılan analizler ve literatürde bildirilen araştırmalar ışığında, balık yemlerinde aflatoksin kontaminasyonunun yasal sınırların altında olduğu gözlemlenmiştir.

Balık üretim tesislerinde kullanılan yemlerin düzenli olarak analiz edilmesi, depolama koşullarının incelenmesi ve gerekli önlemlerin alınması, olası aflatoksin kaynaklı kayıpların önlenmesi açısından önemlidir.

Depolama sırasında küflenmiş yemler tespit edildiğinde, bu yemler balıklara verilmemeli ve uygun yöntemlerle imha edilmelidir. Küf oluşumu, yemlerde toksin birikimine yol açabileceğinden, kullanımının balık sağlığı üzerinde ciddi olumsuz etkiler yaratması ve kitlesel ölümlere neden olması olasılığı bulunmaktadır.

Balıklara sunulan yemlerin taze ve hijyenik olması kritik öneme sahiptir. Depolama sırasında yemler, temiz, kuru ve uygun koşullarda muhafaza edilmelidir. İdeal olarak sıcaklık ve nem kontrolünün sağlandığı ortamlarda saklanmaları tercih edilmelidir.

Üreticiler, satın aldıkları yemlerde aflatoksin bulunmadığını belgeleyen analiz raporu veya garanti belgesi talep etmelidir.

Balık üretim tesisleri, ilgili paydaşlarla işbirliği içinde yemlerin düzenli denetimini sağlamalı ve personelin yem güvenliği konusunda bilinçlendirilmesine yönelik eğitimler düzenlemelidir.

KAYNAKLAR

- Abbas, H.K., Shier, W.T., Horn, B.W., Weaver, M.A. (2004). Cultural methods for aflatoxin detection. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 23(2-3), 295-315. doi:10.1081/TXR-200027854
- Aktüre, A. (2005). *Adana ve ilçelerinde kullanılan alabalık yemlerinde Aspergillus flavus ve aflatoksin araması*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Alinezhad, S., Tolouee, M., Kamalzadeh, A., Motalebi, A.A., Nazeri, M., Yasemi, M., Razzaghi-Abyaneh, M. (2011). Mycobiota and aflatoxin B₁ contamination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed with emphasis to *Aspergillus* section Flavi. Iran, *Journal of Fisheries Science*, 10, 363-374.
- Altug, G. ve Beklevik G. (2003). Level of aflatoxin in some fish feeds from fish farming processes, feed factories and imported feeds, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(6), 1247-1252.
- Ames, I.A. (1989). Mycotoxins, economic and health risks. *CAST (Council of Agricultural Science and Technology), Task Force Report*, 116.
- Anandaraj, A., Cleatus, B., Thirukumaran, V., Solayappan, M., Thirunavukkarasu, R. (2025). Aflatoxigenic fungi in fish and fish feed. In *Aflatoxigenic Fungi* (ss. 172–182). CRC Press.
- Anthony, M.H., Francis, D.M., Berka, N.P., Ayinla, G.T., Haruna, O.G. (2012). Aflatoxin contamination in foods and feeds: A special focus on Africa. *Trends Vital Food Control Eng*, 10, 24919.
- AOAC. (1998). *Official methods of analysis of AOAC International (16th ed., 4th rev.)*. Gaithersburg, MD.
- AOAC. (1999). *Official methods of analysis – Method 999.07: Aflatoxin B₁ and total aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder (21st ed.)*. Rockville, MD.

- AOAC. (2003). *Official method 2003.02: Aflatoxin B₁ in cattle feed (immunoaffinity column liquid chromatography method, first action)*. Washington, DC.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. (1965). The structures of aflatoxins B and G₁. *Journal of the American Chemical Society*, 87(4), 882-886.
- Ashley, L.M. ve Halver, J.E. (1963). Multiple metastasis of rainbow trout hepatoma. *Transactions of the American Fisheries Society*, 92(4), 365-371. doi:10.1577/1548-8659(1963)92[365:MMORTH]2.0.CO;2
- Asplin, F.D. ve Carnaghan, R.B.A. (1961). The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Veterinary Record*, 73, 1215-1219.
- Bailey, G.S., Williams, D.E., Hendricks, J.D. (1996). Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. *Environmental Health Perspectives*, 104(1), 5. doi:10.1289/ehp.96104s15
- Bailey, G.S., Williams, D.E., Wilcox, J.S., Loveland, P.M., Coulombe, R.A., Hendricks, J.D. (1988). Aflatoxin B₁ carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. *Carcinogenesis*, 9(11), 1919-1926.
- Barany, A., Guilloto, M., Cosano, J., De Boevre, M., Oliva, M., De Saeger, S., Mancera, J. M. (2021). Dietary aflatoxin B₁ (AFB₁) reduces growth performance, impacting growth axis, metabolism, and tissue integrity in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 533, 736189. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736189
- Barbosa, T.S., Pereyra, C.M., Soleiro, C.A., Dias, E.O., Oliveira, A.A., Keller, K.M., Rosa, C.A. (2013). Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. *International Aquatic Research*, 5(1), 3. doi: 10.1186/2008-6970-5-3
- Bbosa, G.S., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W.W., Kyegombe, D.B. (2013). Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*, 12, 239-265.
- Blount, W.P. (1961). Turkey "X" disease. *Journal of the British Turkey Federation* 9, 52-54.
- Carvajal-Moreno, M. (2015). Metabolic changes of aflatoxin B₁ to become an active

- carcinogen and the control of this toxin. *Immunome Research*, 11(2), 1. doi: 10.4172/1745-7580.10000104
- Daniel, A.O., Ochi, D.O., Adejumo, A., Muhammad, H.L., Saidu, A.N., Atehnkeng, J., Makun, H.A. (2016). Mycotoxicological concerns with sorghum, millet and sesame in Northern Nigeria. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 7(5). doi:10.4172/2155-9872.1000336
- Dutta, T.K. ve Das, P. (2001). Isolation of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* and detection of aflatoxin B1 from feeds in India. *Mycopathologia*, 151(1), 29-33. doi: 10.1023/A:1010960402254
- Ellis, R.W., Clements, M., Tibbetts, A., Winfree, R. (2000). Reduction of the bioavailability of 20 µg/kg aflatoxin in trout feed containing clay. *Aquaculture*, 183(1-2), 179-188. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00292-6
- Fallah, A.A., Pirali-Kheirabadi, E., Rahnama, M., Saei-Dehkordi, S.S., Pirali-Kheirabadi, K. (2014). Mycoflora, aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in fish feed. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 6(4), 419-424. doi:10.3920/QAS2012.0186
- Guchi, E. (2015). Implication of aflatoxin contamination in agricultural products. *American Journal of Food and Nutrition*, 3(1), 12-20. doi:10.12691/ajfn-3-1-3
- Hafez, E., Abd El-Aziz, N.M., Darwish, A.M., Shehata, M.G., Ibrahim, A.A., Elframawy, A. M., Badr, A.N. (2021). Validation of new ELISA technique for detection of Aflatoxin B1 contamination in food products versus HPLC and VICAM. *Toxins*, 13(11), 747. doi:10.1007/s12550-025-00582-5
- Hamilton, P. (1990). Problems with mycotoxins persist, but can be lived with, *Feedstuffs*, 62(4), 22-23.
- Hardy, R.W. (1989). Diet preparation. J. E. Halver (Ed.), *Fish nutrition* (2nd ed., ss. 475–548). London: Academic Press.
- Hassan, A.A., Hassan, M.A., El Shafei, H.M., El Ahl, M.H.S.R., Abd El-Dayem, R.H. (2011). Detection of aflatoxigenic moulds isolated from fish and their products and its public health significance. *Nature and Science*, 9(9), 106-114.
- Jayaraman, P. ve Kalyanasundaram, I. (1990). Natural occurrence of toxigenic fungi and

- mycotoxins in rice bran. *Mycopathologia*, 110(2), 81-85. doi:10.1007/BF00446995
- Kaymak, T. (2001). *Türkiye'de üretilen alabalık yemlerindeki aflatoksin düzeylerinin tespiti*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kew, M.C. (2012). Hepatocellular carcinoma in developing countries: Prevention, diagnosis and treatment. *World Journal of Hepatology*, 4(3), 99. doi:10.4254/wjh.v4.i3.99
- Lee, S.J., Hedstrom, O.R., Fischer, K., Wang-Buhler, J.L., Sen, A., Cok, I., Buhler, D.R. (2001). Immunohistochemical localization and differential expression of cytochrome P450 3A27 in the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177(2), 94-102. doi:10.1006/taap.2001.9289
- Levin, R.E. (2012). PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 1-6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.001
- Logan, M. (2010). *Biostatistical design and analysis using r: a practical guide*. WileyBlackwell, London. 546 p.
- Loosmore, R.M. ve Harding, J.D.J. (1961). A toxic factor in Brazilian ground-nut causing liver damage in pigs. *Veterinary Record*, 73, 1362-1364.
- Lovell, R.T. (1992). Mycotoxins: hazardous to farmed fish. *Feed International*, 13(3), 24-28.
- Mahfuz, M., Gazi, M.A., Hossain, M., Islam, M.R., Fahim, S.M., Ahmed, T. (2020). General and advanced methods for the detection and measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites: a review. *Toxin Reviews*. doi:10.1080/15569543.2018.1514638
- Marijani, E., Wainaina, J. M., Charo-Karisa, H., Nzayisenga, L., Munguti, J., Gnonlonfin, G.J. B., Okoth, S. (2017). Mycoflora and mycotoxins in finished fish feed and feed ingredients from smallholder farms in East Africa. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(2), 169-176. doi:10.1016/j.ejar.2017.07.001
- Merako, K. (2010). *Alabalık yetiştiriciliğinde kullanılan yemlerin ağır metal ve aflatoksin içeriğinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ
- Mmongoyo, J.A., Wu, F., Linz, J.E., Nair, M.G., Mugula, J.K., Tempelman, R.J., Strasburg, G.M. (2017). Aflatoxin levels in sunflower seeds and cakes collected from micro-and small-scale sunflower oil processors in Tanzania. *PLoS One*, 12(4), e0175801. doi:

10.1371/journal.pone.0175801

- Murjani, G. (2003). Chronic aflatoxicosis in fish and its relevance to human health. *Central Institute of Freshwater Aquaculture, India*, 17.
- Mutiga, S.K., Hoffmann, V., Harvey, J.W., Milgroom, M.G., Nelson, R.J. (2015). Assessment of aflatoxin and fumonisin contamination of maize in western Kenya. *Phytopathology*, 105(9), 1250-1261. doi:10.1094/PHYTO-10-14-0269-R
- Nikawa, H., Yamamoto, T., Hamada, T., Rahardjo, M. B., Murata, H., Nakanoda, S. (1997). Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *Journal of Oral Rehabilitation*, 24(5), 350-357. doi: 10.1111/j.1365-2842.1997.tb00339.x
- Nomura, H., Ogiso, M., Yamashita, M., Takaku, H., Kimura, A., Chikasou, M., Yamada, H. (2011). Uptake by dietary exposure and elimination of aflatoxins in muscle and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 5150-5158.
- Oliveira, M. ve Vasconcelos, V. (2020). Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. *Toxins*, 12(3), 160.
- Peng, K., Chen, B., Zhao, H., Huang, W. (2021). Toxic effects of aflatoxin B1 in Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *Toxins*, 13(12), 844. doi:10.3390/toxins13120844
- Perez, R. (1984). Hepatic neoplasia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) bred in El Zarco Fish Hatchery, Federal District. *Veterinaria Mexico*, 15(4), 255-261.
- Pickova, D., Ostry, V., Toman, J., Malir, F. (2021). Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation. *Toxins*, 13(6), 399. doi: 10.3390/toxins13060399
- Pier, A.C., Richard, J.L., Cysewski, S.J. (1980). Implications of mycotoxins in animal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176(8), 719-724.
- Rasmussen, H.B., Larsen, K., Hald, B., Moeller, B., Elling, F. (1985). Outbreak of liver-cell carcinoma among saltwater-reared rainbow trout *Salmo gairdneri* in Denmark. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1, 191-196.
- Reddy, K.R.N. ve Salleh, B. (2011). Co-occurrence of moulds and mycotoxins in corn grains used for animal feeds in Malaysia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(5),

668-673.

- Resmî Gazete. (2014). *Yemlerde istenmeyen maddeler hakkında tebliğ*. Ankara: Resmî Gazete.
- Rodríguez-Cervantes, C.H., Ramos, A.J., Robledo-Marenco, M.L., Sanchis, V., Marín, S., Girón-Pérez, M.I. (2013). Determination of aflatoxin and fumonisin levels through ELISA and HPLC, on tilapia feed in Nayarit, Mexico. *Food and Agricultural Immunology*, 24(3), 269-278. doi:10.1080/09540105.2012.684202
- Samarajeewa, U., Sen, A.C., Cohen, M.D., Wei, C.I. (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 53(6), 489-501. doi:10.4315/0362-028X-53.6.489
- Santacroce, M.P., Conversano, M.C., Casalino, E., Lai, O., Zizzadoro, C., Centoducati, G., Crescenzo, G. (2008). Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 18(1), 99-130. doi: 10.1007/s11160-007-9064-8
- Schoental, R. (1967). Aflatoxins. *Annual Review of Pharmacology*, 7(1), 343-356. doi: 10.1146/annurev.pa.07.040167.002015
- Shabeer, S., Asad, S., Jamal, A., Ali, A. (2022). Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. *Toxins*, 14(5), 307. doi: 10.3390/toxins14050307
- Siller, W.G. ve Ostler, D.C. (1961). The histopathology of an entero-hepatic syndrome of turkey poult. *Veterinary Record*, 73, 134-138.
- Sipos, P., Peles, F., Brassó, D.L., Béri, B., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., Győri, Z. (2021). Physical and chemical methods for reduction in aflatoxin content of feed and food. *Toxins*, 13(3), 204. doi:10.3390/toxins13030204
- Stewart, D. ve Larson, E. (2002). *Aflatoxicosis in wildlife* (Information Sheet No. 1582). Mississippi State University Extension Service, U.S. Department of Agriculture.
- Stroka, J., von Holst, C., Anklam, E., & Reutter, M. (2003). Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B1 in cattle feed: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 86(6), 1179-1186.
- Sun, S., Xie, J., Peng, T., Shao, B., Zhu, K., Sun, Y., Jiang, H. (2017). Broad-spectrum

- immunoaffinity cleanup for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1, M2 in *Ophiocordyceps sinensis* and its pharmaceutical preparations by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1068, 112-118. doi:10.1016/j.jchromb.2017.10.013
- Tacon, A.G.J., Phillips, M.J., Barg, U.C. (1995). Aquaculture feeds and the environment: the Asian experience. *Water science and Technology*, 31(10), 41-59. doi:10.2166/wst.1995.0363
- Tahir, N.I., Hussain, S., Javed, M., Rehman, H., Shahzady, T.G., Parveen, B., Ali, K.G. (2018). Nature of aflatoxins: Their extraction, analysis, and control. *Journal of Food Safety*, 38(6), e12561. doi:10.1111/jfs.12561
- Thompson, C. ve Henke, S.E. (2000). Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. *The Journal of Wildlife Diseases*, 36(1), 172-179. doi:10.7589/0090-3558-36.1.172
- Tian, F., Lee, S.Y., Woo, S.Y., Chun, H.S. (2020). Alternative oxidase: a potential target for controlling aflatoxin contamination and propagation of *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 419. doi:10.3389/fmicb.2020.00419
- Valsta, L.M., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (1988). The significance of glutathione conjugation for aflatoxin B1 metabolism in rainbow trout and coho salmon. *Food and chemical toxicology*, 26(2), 129-135. doi:10.1016/0278-6915(88)90109-3
- Van der Zijden, A.S.M., Koelensmid, W.B., Boldixgh, J., Barrett, C.B., Ord, W.O., Philp, J. (1962). Isolation in crystalline form of a toxin responsible for Turkey X disease. *Nature*, 195, 1060-1062.
- Wannop, C.C. (1961). The histopathology of turkey" X" disease in Great Britain. *Avian Diseases*, 5(4), 371-381. doi:10.2307/1587768
- Wannop, C.C. (1963). Groundnut Toxicity in Poultry: Turkey X Disease. *British Veterinary Journal*, 119(4), 174-177. doi:10.1016/S0007-1935(17)42453-5
- Williams, D.E. ve Buhler, D.R. (1983). Purified form of cytochrome P-450 from rainbow trout with high activity toward conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin B1-2, 3-epoxide. *Cancer Research*, 43(10), 4752-4756.
- Wunder, W. Ve Korn, H. (1982). Aflatoxin cancer (hepatoma) in the liver of the rainbow trout (*Salmo irideus*). *Zoologische Beitrage*, 28, 99-109.

- Xu, F., Baker, R.C., Whitaker, T.B., Luo, H., Zhao, Y., Stevenson, A., Zhang, G. (2022). Review of good agricultural practices for smallholder maize farmers to minimise aflatoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 15(2), 171-186. doi: 10.3920/WMJ2021.2685
- Yaroglu, T. ve Gül, M. (2007). Erzurum İli Piyasasında Tüketime Sunulan Yavru Alabalık Yemlerinde Aflatoksin B1 Varlığının Araştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2), 51-58.
- Yin, Y.N., Yan, L.Y., Jiang, J.H., Ma, Z.H. (2008). Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(10), 787-792. doi: 10.1631/jzus.B0860003
- Zaboli, F., Khosravi, A. R., Gholampourazizi, I., Norouzi, M., Erfanmanesh, A. (2010). Study of aflatoxins production in rice bran from Mazandran Province, Northern Iran, *Global Veterinaria*, 5(1), 39-44.
- Zhongzhi, H. ve Limiao, D. (2020). Aflatoxin contaminated degree detection by hyperspectral data using band index. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111159. doi: 10.1016/j.fct.2020.111159

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Balık Yemlerinde Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 Düzeylerinin Saptanması” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

...Ebru Yılmaz...

Öğrencinin Adı ve Soyadı

.../ ... / ...

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : YILMAZ Ebru
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Iğdır / 22.11.1983
Telefon : +90 5313396923
E-posta : ebruyilmaz@adu.edu.tr
Yabancı dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2014
Y. Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2009
Lisans	Balıkesir Üniversitesi	2006

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2011-Devam	AYDIN/ADÜ	Doç.Dr.