

Karma Yemlerde Aflatoksin Oluşum Potansiyeli (*)

Prof. Dr. Selahattin SERT

*Atatürk Üni. Zir. Fak. Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü — ERZURUM***ÖZET**

Aspergillus parasiticus ile aşılanan steril besli, süt ve yumurta karma yemlerinde aflatoksin oluşum potansiyeli araştırılmıştır. Örnekler **A. parasiticus** sporlarıyla aşılanmış ve % 85 nisbi nemde, 25°C de 1, 3, 5 hafta depolanmışlardır. Bu süreler sonunda ince tabaka kromatografisi yöntemi ile yapılan analizlerde sırasıyla, besi yeminde; 9427, 3904, 1286 µg/kg, süt yeminde; 11367, 3884, 4639 µg/kg, yumurta yeminde; 3047, 8381, 3134 µg/kg aflatoksin ($B_1 \pm G_1$) tesbit edilmiştir. Elde edilen bu değerler, literatürde sterilize edilmemiş karma yemler için verilen değerlerden çok yüksek bulunmuştur. Bu durum, sterilize edilmeyen yemlerde doğal mikrofloranın aynı ortamdaki besin maddelerine ortak olması ve **A. parasiticus** tarafından üretilen aflatoksini metabolize etmesi ihtimaliyle izah edilmiştir.

Bulgular, **A. parasiticus** ile aşılanan sterilize edilmiş karma yemlerde % 85 nisbi nemde, 25°C sıcaklıkta yüksek düzeyde aflatoksin oluşum potansiyelinin varlığını göstermiştir.

SUMMARY**Aflatoxin B_1 and G_1 Production in the Sterilized Mixed Feeds which Were Inoculated with *Aspergillus parasiticus*.**

The three kind mixed feeds were sterilized and inoculated with **Aspergillus parasiticus**. The feeds were inoculated at 85 % relative humidity and 25°C for 1, 3 5 weeks. Aflatoxins were analysed with thin layer chromatography. For three incubation periods, the aflatoxin ($B_1 \pm G_1$) contents in fattening feeds, dairy cattle feeds and layer feeds were found to be as 9427, 3094, 1286 µg/kg; 11367, 3884, 4639 µg/kg; 3047, 8381, 3134 µg/kg, respectively. These values are higher than those in the literature for unsterilized feeds. This difference might be attributed to the natural microflora which possibly consumed the some nutrient simultaneously in unsterilized feeds also likely metabolized the aflatoxin produced by **A. parasiticus**.

The findings indicated that sterilized mixed feeds inoculated with **A. parasiticus** and stored at 85 % relative humidity, 25°C, had a high potential of aflatoxin production.

GİRİŞ

1960 da İngiltere'de, rasyonlarında yer fıstığı küspesi bulunan 100.000 kadar hindi palazı ani olarak ölmüştür. Sebepi bilinmeyen bu hastalığa 'Hindi-X Hastalığı' denilmiştir. Aynı tarihlerde Doğu Afrika'nın bazı çiftliklerinde benzer hastalık sebebinden çok sayıda ördek ve sülün yavrularının da öldüğü görülmüştür. Bu durum karşısında yoğun araştırmalar yapılmış ve nihayet afet görünümü alan bu olaylara, **Aspergillus flavus** tarafından oluşturulan bir mikotoksinin yol açtığı ortaya çıkarılmıştır. Bu mikotoksine «aflatoksin» adı verilmiştir (GOLDBLATT, 1966, 1971). Daha sonraları **Aspergillus parasiticus**'un da fazla miktarda aflatoksin üretilme yeteneğine sahip olduğu tesbit edilmiştir (NAGARAJAN ve BHAT, 1973).

Aflatoksinler, bilinen karaciğer kanserojenik maddelerinin en etkililerinden biridir. Bunlar insan ve hayvanlarda, ölüme kadar yol açabilen, çeşitli hastalıklara sebep olurlar. Ayrıca, aflatoksinli yemlerle beslenen hayvanların süt, yumurta ve etlerinde de toksin birikebilir (KEYL ve BOOTH, 1971; HOWART ve WYATT, 1976; MINTZLAFF ve ark., 1974). Bu durum, insan sağlığı açısından konunun önemini daha da artırmıştır. Birçok gıda ve yem maddesi tarlada, ambarda, işlenmeleri veya nakledilmeleri esnasında, başta toprak, hava ve su olmak üzere çeşitli kaynaklardan mikroorganizmalarla buluşurlar. Gelişmeleri için uygun nisbi nem ve sıcaklık gibi çevre şartlarını bulan mikroorganizmalar çoğalarak toksinlerini veya diğer metabolitlerini oluştururlar. İlgili olarak, bu ortamda **A. parasiticus** veya **A. flavus** türlerinin bulunmasıyla aflatoksinler de meydana gelebilir. Ancak böyle bir ortamda aflatoksinin oluş-

(*) Bu makalenin özeti 5 - 7 Eylül 1988 tarihinde Ankara'da yapılan I. Ulusal Biyoteknoloji Sempozyumuna tebliğ olarak sunulmuştur.

ların aflatoksin üretim potansiyeli tam olarak belirlenemez. Çünkü, ortamda diğer mikroorganizmaların da bulunması, aynı besin maddelerini ortaklaşa kullanma durumunu yani, neketi ortaya çıkarır (JARVIS, 1971; DENİZEL, 1979). Ayrıca, diğer mikroorganizmaların oluşturdıkları metabolik artıklar, aflatoksin oluşturan küflerin gelişmesini engelleyebilir veya ürettikleri aflatoksinleri detoksifiye edebilir (CIEGLER ve ark., 1966; BOLLER ve SCHROEDER, 1974 a, 1974 b; DIENER, 1976). Bu engellerin kaldırılması, substratın sterilize edilerek ortamın tamamen aflatoksijenik suşlara bırakılmasıyla mümkün olur. Bu konuda değişik materyaller üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, DIENER ve DAVIS (1967) tarafından, sterilize edilerek *A. flavus* ile aşılana ve % 97-99 nisbi nemlerde 5°C'den 55°C'ye kadar değişen sıcaklıklarda, 7 ile 21 gün depolanan yer fıstıklarında aflatoksin oluşum limitleri tesbit edilmiştir. Aflatoksin üretimi için, 25°C'de 21 gün inkübe edilen yer fıstıklarında % 85 ± 1 nisbi nemin limit değer olduğu, % 97-99 nisbi nemlerde 21 gün bekletilen yer fıstıklarında en düşük sıcaklık derecesinin 13 ± 1°C, en yüksek sıcaklığın 41,5 ± 1,5°C olarak bulunduğu, 43°C'deki küf gelişmesi ve spor teşekkülünün 40°C ile aynı olduğu fakat, aflatoksin üretiminin olmadığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından, yüzey sterilizasyona tabi tutulan iki çeşit yer fıstığında, farklı sıcaklık ve nisbi nemlerde, 7. ve 21. günlerin sonunda oluşan aflatoksin miktarları belirlenmiştir (DIENER ve DAVIS, 1968). Bu araştırmacılar, aflatoksin oluşumuna etki eden başlıca üç faktör üzerinde durduklarını, bu faktörlerin; (1) *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatlarının toksin üretme yetenekleri, (2) üzerinde toksin üretilen maddelerin tabiatı ve (3) bu maddeyi kuşatan çevre şartları olduğunu bildirmişlerdir. Kurdukları denemede, sağlam, zedeli, olgunlaşmamış iç ve kabuklu yer fıstıklarının bir grubunu sterilize ettikten sonra, diğer grubunu doğal mikroflorasına dokunmadan *A. flavus* ile aşılarak 10-45°C'de % 70-99 nisbi nemlerde, farklı gaz ortamlarında 7, 21, 42, 84 gün süreyle inkübe etmişler ve bu faktörlerin küf gelişmesi ve aflatoksin üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Aflatoksin üretim miktarının, küf suşlarının farklılığına, fıstıkların

sağlamlık derecesine, inkübasyon esnasında fıstıkların sallanmasına veya sabit bırakılmasına ve mikrofloranın birbirlerini etkileme durumuna göre değiştiğini tesbit etmişlerdir (DIENER ve BAVIS, 1969). Kuru fasulyelerde sıcaklığın ve rutubet muhtevasının aflatoksin oluşumuna etkisini araştıran BEUCHAT ve LECHOWICH (1970), kuru fasulye örneklerini sterilize ederek rutubet muhtevalarını % 20, 25, 30'a ayarlamışlar, *A. parasiticus* sporlarıyla aşıladıktan sonra 21, 28, 35°C'de 1, 3, 5 hafta inkübe ederek aflatoksin analizi yapmışlardır. % 25 ve 30 rutubet ihtiva eden fasulyelerde, bütün sıcaklık derecelerinde aflatoksin oluştuğunu kaydetmişlerdir.

Bu çalışmada, sterilize edilerek *Aspergillus parasiticus* ile aşılana karma yemlerde aflatoksin oluşum potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla, otoklavda sterilize edilen üç çeşit karma yem *A. parasiticus* sporlarıyla inoküle edilmiş ve 25°C'de % 85 nisbi nemde 1, 3 ve 5 hafta inkübe edilerek, bu sürelerin sonunda aflatoksin B₁ ve G₁ oluşumu izlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu araştırmada, siğir-koyun best, süt ve yumurta karma (pelet) yem örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerin aflatoksin içermediği önceki çalışmamızda tesbit edilmiştir (SERT, 1984).

Yemlerin aşılamaında kullanılan *Aspergillus parasiticus* NRRL suşu «Northern Regional Research Centre 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA», Aflatoksin B₁ ve G₁ standartları, «Food and Drug Administration, Washington, D.C. 20204, USA» adreslerinden temin edilmiştir.

Yöntem

Aspergillus parasiticus'un Kuru Sporlarının Elde Edilmesi ve Yem Örneklerinin Aşılması : *A. parasiticus* kültürlerinden steril mısırlar aşılanarak kuru sporlar elde edilmiştir (DENİZEL, 1979). Her yem örneğinden 180 g tartılarak kavanozlara konulmuş, otoklavda sterilize edilmiş ve küf sporlarıyla aşılanmıştır (BEUCHAT ve LECHOWICH, 1970). Aşılanan örneklerden 60'ar g alınarak tel sepetlere konulmuştur.

Örneklerin inkübasyonu : Kapalı ortamda % 85 nisbi nem temin etmek için doymuş KCl çözeltisinden faydalanılmıştır (BOLLER ve SCHROEDER, 1974 a, 1974 c). Kapaklarının ortası 14 mm çapında delinerek pamuklanan ve dip kısmına cam sayacıkları yerleştirilerek içerisine doymuş KCl çözeltisi konulan kavanozlar, otoklavda sterilize edilmişlerdir. Tel sepetlerdeki yem örnekleri kavanozlara yerleştirilerek 30°C'de 1, 3, 5 hafta sürelerle inkübasyona terk edilmişlerdir.

Aflatoksin Analizleri

Yemler, inkübasyon sürelerinin sonunda etüvden çıkarılmış ve su banyosunda küf sporlarının öldürülmesi sağlanmıştır (SHOTWELL

ve ark., 1966). Pelet yem örnekleri Waring blenderde parçalanıp 2 mm'lik elekten geçirildikten sonra, 25 g alınarak iki paralel halinde aflatoksin analizlerine geçilmiştir. Aflatoksin standartlarının hazırlanmasında ANONYMOUS (1975)'dan faydalanılmıştır. Aflatoksin analizlerinde uygulanan ekstraksiyon, kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi safhaları PONS ve ark. (1966, 1972) tarafından önerilen metodlara göre yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sterilize edilerek *A. parasiticus* ile aşılanan karma yemlerin % 85 nisbi nemde 25°C de 1, 3, 5 hafta sürelerle depolanmaları sonucunda oluşan aflatoksin miktarları Çizelge 1

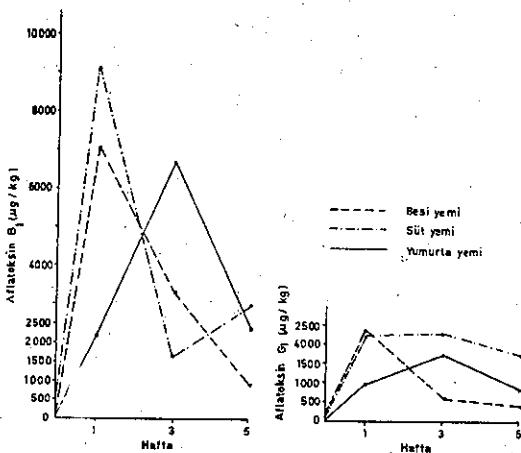
Çizelge 1. Sterilize edilerek *A. parasiticus* ile aşılanan karma yemlerde 25°C de, % 85 nisbi nemde aflatoksin oluşumu

Yem Çeşidi	1. Hafta				3. Hafta				5. Hafta			
	Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
Besi	7084	2343	9427	3333	571	3904	900	386	1286			
Süt	9167	2200	11367	1634	2250	3884	2496	1693	4639			
Yumurta	2067	980	3047	6667	1714	8381	2334	800	3134			

ve Şekil 1 de verilmiştir. Görüldüğü gibi, her üç karma yemde, bütün haftalarda toksin oluşmuştur. Inkübasyon süreleri sonunda tesbit

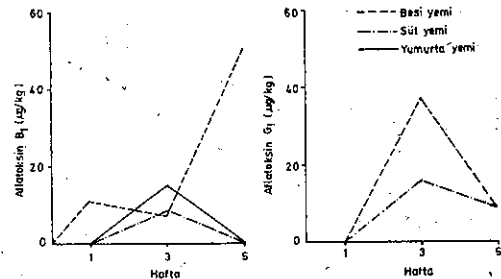
(SCOTT, 1978) düşünülürse, tesbit edilen bu miktarların çok yüksek olduğu görülür.

Yem örneklerinde oluşan aflatoksin B₁ ± G₁ miktarları, sterilize edilmeksizin, *A. parasiticus* ile aşılanıp aynı şartlarda depolanan yemlere göre (SERT, 1989) daha yüksek çıkmıştır. Bu fazlalık 1., 3., 5. haftalarda sırasıyla besi yeminde; 834, 88, 22, süt yeminde; 11367, 155, 521, yumurta yeminde; 3047, 559, 3134 misli kadar olmuştur (Çizelge 2 ve Şekil 2).



Şekil 1. Sterilize edilerek *A. parasiticus* ile aşılanan karma yemlerde 25°C'de, % 85 nisbi nemde aflatoksin oluşumu.

edilen aflatoksin B₁ miktarları besi yeminde 900 - 7084 $\mu\text{g}/\text{kg}$, süt yeminde 1634 - 9167 $\mu\text{g}/\text{kg}$, yumurta yeminde 2067 - 6667 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında değişmiştir. Karma yemlerde aflatoksin B₁ in tolerans sınırının 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olduğu



Şekil 2. Sterilize edilmeyen *A. parasiticus* ile aşılanan karma yemlerde 25°C'de, % 85 nisbi nemde aflatoksin oluşumu.

Sterilize yemlere *A. parasiticus*'dan başka mikroorganizma bulunmaması, toksin oluşumundaki bu fazlalığın en büyük etkeni olarak gös-

Çizelge 2. Sterilize edilmeden *A. parasiticus* ile aşılanan karma yemlerde 25°C de, % 85 nisbi nemde aflatoksin oluşumu

Yem	1. Hafta			3. Hafta			5. Hafta		
	Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Aflatoksin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
Çeşidi	B ₁	G ₁	B ₁ ±G ₁	B ₁	G ₁	B ₁ ±G ₁	B ₁	G ₁	B ₁ ±G ₁
Besi	11,3	—	11,3	7,1	37,5	44,6	50,0	8,6	58,6
Süt	—	—	—	8,9	16,1	25,0	—	8,9	8,9
Yumurta	—	—	—	15,0	—	15,0	—	—	—

terilebilir. Çünkü, besin maddelerine ortak olan ve toksin oluşumunu engelleyen mikroorganizmalar sterilizasyon ile ortadan kaldırılmış, ortam tamamen *A. parasiticus*'a bırakılmıştır. Ayrıca, sterilize edilmeyen yemlerde, doğal mikrofloranın, *A. parasiticus* tarafından üretilen aflatoksinin parçalayarak azalmasına yol açması da mümkündür. Benzer çalışmalar ile DENİZEL ve ark. (1976), sterilize edilerek *A. flavus* ile aşılanan Antep fıstıklarında oluşan aflatoksin miktarının sterilize edilmeyenlere göre 10 - 1000 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, steril fıstıklarda rekabet edecek başka küflerin yokluğunun, toksin oluşumundaki farkın en önemli sebebi olabileceğini ayrıca, sterilizasyon ile, fıstıklarda meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişikliklerin de toksin üretimini artırabileceğini ileri sürmüşlerdir. DENİZEL (1979), 29±1°C'de depolanan sterilize edilmiş mısırlarda da yüksek oranda aflatoksin (B₁±G₁) tesbit etmiştir. Bu miktarların 1. hafta 62500, 3. hafta 14750, 5. hafta 21000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olduğu kaydedilmiştir.

Yem örneklerinde genellikle 1. haftadan sonra meydana gelen aflatoksin azalması, aflatoksin üreten küfün kendisinin, oluşturduğu aflatoksinin metabolize etmesiyle ve aflatoksinin zamanla karma yem bileşenleriyle kimyasal tepkimeye girerek parçalanmasıyla izah edilebilir. Nitekim SCHROEDER (1966), *A. parasiticus* ile aşılanan steril yer fıstığı ve pirinçlerde, inkübasyonun 8. gününde maksimum aflatoksin üretimine ulaşıldığını, daha sonraki günlerde ise aflatoksin miktarında düşme görüldüğünü saptamış bunu, ortamdaki besin maddelerinin azalması sebebiyle *A. parasiticus*'un kendi ürettiği toksini metabolize etme ihtimaline bağlanmıştır. ASHWORTH ve ark. (1965)

da, birçok küf gibi, aflatoksin üreten *A. flavus*'un da aflatoksin kullanabilme yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. BEUCHAT ve LECHOWICH (1970), sterilize edilerek *A. parasiticus* sporlarıyla aşılanan % 30 rutubet içeren kuru faasulye örneklerinden navy çeşidinin 28°C de 1, 3, 5 hafta depolanması sonucunda sırasıyla, 321, 257, 114 $\mu\text{g}/\text{g}$, aynı şartlarda pinto çeşidinde ise 0,5, 417, 245 $\mu\text{g}/\text{g}$ aflatoksin (B₁±G₁) oluştuğunu kaydetmişlerdir. Araştırmacılar, aflatoksin miktarındaki düşme ile ilgili olarak, küflerin veya fasulye komponentlerinin aflatoksin parçalayabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir. NOUR ve ark. (1981) da, 21 gün depolanan kümes hayvanları karma yemlerinde 0,2 - 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında aflatoksin B₁ tesbit etmişler, depolama süresinin 45 güne çıkarılmasıyla örneklerin çoğunda aflatoksin rastlanmamışlardır. *A. parasiticus* ile aşılanan ve 25°C'de bekletilen pirinç ve soya fasulyelerinde 21 gün sonra tesbit edilen aflatoksin miktarları, 10 gün sonrakine göre daha az olmuştur (PARK ve BULLERMAN, 1983).

Değişik nisbi nem ve sıcaklıklarında, belirli süreler ile inkübe edilen karma yemlerde meydana gelen aflatoksin B₁±G₁ miktarları ile B₁/G₁ oranları, yem çeşitlerine göre bazı farklılıklar göstermiştir. Örneğin besi, süt ve yumurta yemlerinde 3. haftada oluşan aflatoksin B₁±G₁ miktarlarının sırasıyla 3904, 3884, 8381 $\mu\text{g}/\text{kg}$, B₁/G₁ oranlarının ise 5,8, 0,7, 3,9 olduğu saptanmıştır. Bu durum, yemlerin hazırlanmasında kullanılan maddelerin çeşit ve oran bakımından değişik olmasıyla ve bunun sonucu olarak, yemlerin kimyasal ve fiziksel yönden farklılık göstermesiyle izah edilebilir. Farklı materyaller üzerinde değişik miktarlarda aflatoksin oluştuğu birçok araştırmada da

gözlenmiştir. Sterilize edilerek *A. parasiticus* ile inoküle edilen buğdayda 770 ng/g, yulafta 560 ng/g, 165 ng/g aflatoksin olduğu bildirilmiştir (EDDS, 1979). Hatta aynı çeşit mahsulün değişik varyeteleri arasında bile önemli farklar çıkmıştır. BEUCHAT ve LECHOWICH (1970), sterilize edilerek *A. parasiticus* ile aşılanan ve 28°C'de 5 hafta depolanan % 30 rutubet içerikli navy, pinto ve kidney çeşidi kuru fasulye örneklerinde aflatoksin B₁±G₁ miktarlarının sırasıyla 114, 225 ve 424 µg/g, B₁/G₁ oranlarının ise 8,2, 1,2 ve 0,6 olduğunu kaydetmişlerdir. NAGARAJAN ve BHAT (1973), sterilize edilerek *A. parasiticus* ile inoküle edilen iki farklı yer fıstığı varyetesinin birinde 51600, diğerinde 25000 picogram/g miktarında aflatok-

sin B₁ oluştuğunu tesbit etmişlerdir. Ayrıca SCHROEDER (1960) *A. parasiticus* ile aşılanan yer fıstığı ve pirinçlerde, DIENER ve DAVIS (1967, 1970) *A. flavus*'la inoküle edilen olgunlaşmış ve olgunlaşmamış yer fıstıklarında, aynı şartlarda oluşan aflatoksin miktarlarının farklı olduğunu kaydetmişlerdir. Araştırmacılar, substrat olarak kullanılan maddeler arasındaki kimyasal yapı değişikliklerini, aflatoksin oluşumunu etkileyen en önemli sebep olarak göstermişlerdir.

Sonuç olarak, bulgular *A. parasiticus* ile aşılanan sterilize karma yemlerde % 85 nisbi nemde, 25°C sıcaklıkta yüksek düzeyde aflatoksin oluşum potansiyelinin mevcut olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 1975. Official Methods of the AOAC, 12th ed. AOAC, Washington, 1094 sayfa.
- ASHWORTH, L.J., Jr., H.W. SCHROEDER, B.C. LANGEY, 1965. Aflatoxins : Environmental factors governing occurrence in Spanish peanuts. Science, 148: 1228 - 1229.
- BEUCHAT, L.R., R.V. LECHOWICH, 1970. Aflatoxins : Production on beans as affected by temperature and moisture content. J. Milk and Food Technol. 33: 373 - 376.
- BOLLER, R.A., H.W. SCHROEDER, 1974 a. Influence of *Aspergillus candidus* on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus* Phytopathology, 64: 121 - 123.
- BOLLER, R.A., H.W. SCHROEDER, 1974 b. Influence of temperature on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. Phytopathology, 64: 283 - 286.
- BOLLER, R.A., H.W. SCHROEDER, 1974 c. Influence of relative humidity on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. Phytopathology, 64: 17 - 21.
- CREGLER, A., E.B. LILLEHOJ, R.E. PETERSON, H.U. HALL, 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14: 934 - 939.
- DENİZEL, T, 1979. Mısırların Depolanmaları Sırasında Oluşan Bazı Mikotoksinler ve Bunların Sinerjetik Etkileri Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi, Ank Üniv. Zir. Fak., Ankara.
- DENİZEL, T., E.J. ROLFE, B. JARVIS, 1976. Moisture equilibrium relative humidity relationships in pistachio nuts with particular regard to control of aflatoxin formation. J. Sci. Food Agric., 27: 1027 - 1034.
- DIENER, U.L, 1976. Environmental factors influencing mycotoxin formation in the contamination of food. Phytopathological Society, 3: 126 - 139.
- DIENER, U.L., N.D. DAVIS, 1967. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. J. Amer. Oil Chem., 44: 259 - 263.
- DIENER, U.L, N.D. DAVIS, 1968. Effect of environment of aflatoxin production in freshly dug peanuts. Trop. Sci., 10: 22 - 28.
- DIENER, U.L, N.D. DAVIS, 1969. Production of aflatoxin on peanut under controlled environments. J. Stored Prod. Res., 5: 251 - 258.
- DIENER, U.L, N.D. DAVIS, 1970. Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored peanuts. J. Amer. Oil Chem. Soc., 47: 347 - 351.
- GOLDBLATT, L.A., 1966. The mycotoxin problem. Proceedings of the 1965 Cottonseed Processing Clinic. New Orleans, La., ARS 72 - 49 Feb. 8 - 9, p. 3 - 11.
- GOLDBLATT, L.A., 1971. The aflatoxin problem. Background Proceedings of the Twentieth Oilseed Processing Clinic. ARS 72 - 93, p. 31 - 33.

- HOWARTH, B., R.D. WYATT, 1976. Effect of dietary aflatoxin on fertility, hatchability and progeny performance of broiler breeder hens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31: 680-684.
- JARVIS, B., 1971. Factors affecting the production of mycotoxins. *J. Appl. Bact.*, 34: 199-213.
- KEYL, A.C., A.N. BOOTH, 1971. Aflatoxin effects in livestock. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 48: 599-604.
- MINTZLAFF, H.J., R. LÖTZSCH, F. TAUCHMAN, W. MEYER, L. LEINSTER, 1974. Aflatoxin residues in liver and muscles of broilers given aflatoxin with their feed. *Food Sci. Technol. Abst.*, 6: 115, 1463.
- NAGARAJAN, V., R.V. BHAT, 1973. Aflatoxin in peanut varieties by *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Appl. Microbiol.*, 25: 319-321.
- NOUR, M.A., B. ZIENAL, E. EL-SCHAİLİ, 1981. Effect of storage condition on fungal flora and aflatoxin accumulation in poultry mixed feed. *Int. Symp. Workshop of Mycotoxins (Abst. book)*. 6-16 Sept., Cairo, Egypt, p. 26-27.
- PARK, K.Y., L.B. BULLERMAN, 1988. Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.* 46: 178-184.
- PONS, W.A., JR., A.F. CUCULLU, L.S. LEE, J.A. ROBERTSON, A.O. FRANZ, JR., L.A. GOLDBLATT, 1966. Determination of aflatoxins in agricultural products: Use of aqueous acetone for extraction. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 49: 554-562.
- PONS, W.A., JR., A.F. CUCULLU, A.O. FRANZ, JR., 1972. Rapid quantitative TLC method for determining aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 55: 768-774.
- SCHROEDER, H.W., 1966. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Microbiol.*, 14: 381-385.
- SCOTT, P.M., 1978. Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. *J. Food Prot.*, 41: 385-398.
- SERT, S., 1984. Bazı karma yem ve karma yem hammaddelerinin aflatoxin yönünden araştırılması. *Atatürk Üniv. Zir. Fak. Zir. Derg.*, 15: (3-4), 55-63.
- SERT, S., 1989. *Aspergillus parasiticus* ile ağılanan karma yemlerde farklı çevre şartlarının aflatoxin oluşumuna etkisi. *DOĞA, T.O.*, 13: 122-132.
- SHOTWELL, O.L., C.W. HESSELTINE, R.D. STUBBLEFIELD, W.G. SORENSON, 1966. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.*, 14: 425-428.