

YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B₁'İN CİVCİV ÇIKIŞ AĞIRLIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

M. Faruk Aydın¹

İlhami Çelik²

Emrah Sur²

Haluk Özparlak³

Tuğba Telatar²

Effects of in Ovo Given Aflatoxin B₁ on the Chick Hatching Weight

Özet: Bu araştırmada, yumurtaya değişik miktarlarda verilen AFB₁'in, civcivlerin çıkış ağırlıkları üzerindeki etkileri belirlendi. Bu amaçla 360 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalardan, her birinde 60 adet yumurta bulunan kontrol grubu, delinip-kapatılan grup, ETOH grubu, 5ng AFB₁/yumurta grubu, 7.5 ng AFB₁/yumurta grubu ve 10 ng AFB₁/yumurta grubu olmak üzere toplam 6 grup oluşturuldu. Aflatoksin verilen grupların civciv çıkış ağırlıklarında doza bağımlı olarak önemli düşüşler gözlemlendi. Rölatif civciv ağırlıklarında da benzer düşüşler tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B₁, civciv çıkış ağırlığı, embriyotoksosite

Summary : In this study, effects of in ovo given, various doses of aflatoxin B₁ on the chicken hatching weight was investigated. For this purpose, a total of 360 fertilized layer hen's eggs were used. The eggs were divided into 6 groups each having 60 eggs as, controls, drilled-sealed, ETOH, 5 ngAFB₁/egg, 7.5 ngAFB₁/egg and 10 ngAFB₁/egg. Chick hatching weights of the in AFB₁ given groups declined in a dose dependent manner. Similar decrease pattern was also observed in relative embriyo weight values of the groups.

Key Words: AflatoxinB₁, chicken hatching weight, embryotoxicity

Giriş

Yemlerde üreyen aspergillus cinsi içinde yer alan *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un ürettiği aflatoksinlerden (AF) AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ en önemlileri olup (Leeson ve ark., 1995); bunların en tehlikelisi ve en yüksek oranda bulunanı ise AFB₁'dir.

Vücuda alınan AF, karaciğerde Faz-I ve Faz-II reaksiyonlarıyla hidroksilasyon, O-demetilasyon, epoksidasyon ve redüksiyonla metabolize edilerek, bazıları daha da toksik olan ve suda çözünen AFM₁, AFM₂, AFQ₁, AFP₁ ve aflatoksikol (R0) metabolitlerine dönüştürülür. Bunlardan aflatoksikol (R0), mikrozomal dehidrojenazlar tarafından reokside edilerek tekrar AFB₁'e dönüştürüldüğünden, AFB₁'in depo formu olarak da bilinir (Leeson ve ark., 1995). AFB₁'in epoksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan metaboliti olan 8,9-epoksit türevi, DNA'nın nükleofilik bölgelerine tutunarak AFB₁-DNA bileşiklerini (AFB₁-DNA adducts) oluşturan ve AFB₁'in kar-sinojenik etkilerinden sorumlu tutulan metabolittir.

Tüm ülkeler yem ve yem hammaddelerinde bulunan AF düzeylerini yönetmeliklerle sıkı biçimde kontrol altında tutmaktadırlar. Ülkemizde AF için belirlenen limit 20 ppb AF (20 mgAF/kg yem) ve AFB₁ için belirlenen limit ise 10 ppb yani 10 mgAFB₁/kg yemdir (Tarım Bakanlığı Bülteni, 1997). Ancak yapılan tarama çalışmaları sonuçları, bildirilen limitlerin sıklıkla aşıldığını göstermektedir (Kaya, 1982). Özpınar ve ark. (1988), Marmara Bölgesi'nde bir tavuk yemi örneğinde 30.4 ppb düzeyinde AFB₁ saptamışlardır.

Yemle alınan AF kanatlılar üzerinde önemli zararlı etkilere sahiptir. Özellikle et tavukçuluğunda yem tüketimi ve büyüme hızı yüksek olduğundan, birim vücut ağırlığı başına yemle alınan AF oranı nispeten yüksek olmaktadır. AF içeren yemlerle beslenen kanatlılarda karaciğer ve böbreklerde önemli patolojik değişiklikler oluşur. Aflatoksinlerin etkileri arasında asıl önemli olanı, immün sistemde oluşturdukları yetmezliktir (Çelik ve ark., 1996; Çelik ve ark., 2000b). Etkilenen hayvanlarda immün sistem baskılanmış olduğundan, böyle hayvanlar enfeksiyöz ve paraziter hastalıklara

daha duyarlıdır. Hatta yapılacak aşılama ile bile sürü bağıışıklığı istenen düzeye çıkarılmamaktadır. Yemle alınan AF yumurtalara yaklaşık 1/2200-1/2500 oranında geçmektedir (Hamilton, 1982; Çelik ve ark., 2000a). Bu geçiş oranı ve kanuni limitler dikkate alınarak yapılan hesaplama sonuçları (yaklaşık olarak 2.6 ngAFB₁/yumurta), yumurtaya geçen AF'nin zararlı etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Nitekim, Jelinek ve Peterka'nın (1985) tavuk embriyo toksisite belirleme testi (Chick Embryo Toxicity Screening Test I ve II, CHEST-I ve CHEST-II) sonuçları, AF için embriyotoksik doz sınırının 0.3-30 ng/yumurta arasında olduğunu göstermektedir. Yumurtada bulunan AF, kuluçka randımanını etkilemeleri yanında civcivlerin yaşama kabiliyetleri ile bağıışıklık sistemleri üzerinde de önemli zararlı etkiler oluşturabilmektedir (Çelik ve ark., 2000a; Sur, 2001).

Bu araştırmada, yumurtaya değişik miktarlarda ve kuluçka başlangıcında verilen AFB₁'in, civcivlerin çıkış ağırlıkları üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Yumurta materyali

Bu amaçla, yemlerinde düzenli olarak aflatoksin kontrolleri yapılan ve ölçülebilir düzeyde aflatoksin içermeyen yemle beslenen Babcock B-380 ırkı kahverengi yumurtacı damızlıklara ait toplam 360 adet kuluçkalık yumurta kullanılmıştır.

Aflatoksin B1 solüsyonlarının hazırlanması

Çalışmada, kristalize haldeki saf aflatoksin B1 standardı (Makor Chemical Ltd., Box 6570, Jerusalem, Israel) kullanılmıştır. Kristalize haldeki saf aflatoksin B₁ (AFB₁) standardı benzende çözündürmek suretiyle 20 µg/ml konsantrasyonunda AFB₁ içeren stok solüsyon hazırlandı. Bu solüsyon, çalışmada kullanılacak olan her bir konsantrasyon grubu için gerekli

olan AFB₁'i içerecek hacimlerde farklı steril tüplere aktararak; ağızları açık durumda ve benzen tamamen uçuncaya kadar bekletildi. AFB₁ içeren tüplere önceden belirlenen miktarlarda %99,9'luk etil alkol (ETOH) ilave edilerek AFB₁ tamamen eritildi ve takiben, hazırlanan solüsyonlara etil alkol konsantrasyonunu %30'a düşürmek amacıyla steril bi-distile su ilavesi yapılarak, istenilen konsantrasyonlarda, yani 20ml'lik hacimde istenilen AFB₁ miktarını içeren test solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonların istenilen konsantrasyonlarda AFB₁ içerip içermedikleri, standart plakalar (Merck) kullanılarak ince tabaka kromatografisi ve Floresans Spektrofotometre (emiyon 425 nm, eksitasyon 365 nm dalga boyunda) yöntemleriyle kontrol edildi ve her grupta kullanılan test solüsyonunun istenilen konsantrasyonlarda AFB₁ içermeleri sağlandı. Tüpler alüminyum folyolarla sarılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

Deney gruplarının oluşturulması ve AFB₁ solüsyonlarının yumurtalara enjeksiyonu

Bu amaçla yumurtalar, yapılan uygulamalar ve içerdikleri yumurta adetleri aşağıdaki (Tablo 1) verilmiş olan 6 gruba ayrıldı.

Enjeksiyon işlemlerinden önce tüm yumurtalar hassas teraziyle tartıldı ve takiben küt uçları %96'lık etil alkolle dezenfekte edildi. Tüm enjeksiyonlar hava kamarası yoluyla ve kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Deliklerin açılmasında bu iş için özel yumurta delicisi kullanıldı. Deliklerin kapatılması sıvı parafinle yapıldı. Enjeksiyonlar steril uçlu mikropipet (Sealpette, Jencons, Finland) kullanılarak yapıldı. Kuluçka işlemleri, S.Ü.Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki 2000 yumurta kapasiteli kuluçka makinesinde (Gostyn, Poland), optimal koşullarda (37,8 °C sıcaklık, %65 nispi nem oranı ve 2 saatte bir kez çevrilerek) gerçekleştirildi.

Tablo 1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.

GRUPLAR	YUMURTALARA UYGULANAN İŞLEM
n=60	
Kontrol grubu	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Delinip-kapatılan grup	Küt uçları delinerek sıvı parafinle kapatma.
ETOH-grubu	Hava kamarası yoluyla 20 µl, %30'luk etil alkol enjeksiyonu.
5ng AFB ₁ /yumurta grubu	Hava kamarası yoluyla 20 µl hacminde %30'luk etil alkol içerisinde çözündürülmüş 5 ng AFB ₁ enjeksiyonu.
7.5 ng AFB ₁ /yumurta grubu	Hava kamarası yoluyla 20 µl hacminde %30'luk etil alkol içerisinde çözündürülmüş 7.5 ng AFB ₁ enjeksiyonu.
10 ng AFB ₁ /yumurta grubu	Hava kamarası yoluyla 20 µl hacminde %30'luk etil alkol içerisinde çözündürülmüş 10 ng AFB ₁ enjeksiyonu.

Kuluçka sonunda çıkan civcivler tartılarak civciv çıkış ağırlıkları belirlendi. Civciv çıkmayan yumurtalar kırılarak kuluçka randımanı ve dölsüzlük oranları da belirlendi. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edilerek gruplar arası farkların önem dereceleri belirlendi.

Bulgular

Çalışmada kullanılan yumurtaların başlangıç ağırlıkları 64.15-65.50 g arasındaydı. Araştırmada kullanılan yumurtaların ortalama infertilitesi %6.66 olarak hesaplandı. Kontrol grubunun mortalitesi %3.57 iken, delinip-kapatılan grubun mortalitesi %6.89 olarak hesaplandı (Tablo 2). Her iki grupta da anormal embriyoya rastlanmadı. Solvent grubunun (%30 etanol, ETOH) mortalitesi kontrol grubundakilerden oldukça yüksekti (%12.28). AFB₁ verilen grupların mortalitelerinde doza bağımlı olarak belirgin artışlar gözlemlendi. Bu değerler 5 ngAFB₁/yumurta grubunda %41.81, 7.5 ngAFB₁/yumurta grubunda %64.91 iken, 10 ngAFB₁/yumurta grubunda ise %81.81 olarak tespit edildi.

Kontrol ve delinip-kapatılan grupların civciv çıkış ağırlıkları birbirine oldukça yakın ($P>0.05$) iken; ETOH grubu ve AFB₁ gruplarının civciv çıkış ağırlıkları önemli derecede ($P<0.05$) düşük civciv çıkış ağırlıklarına sahipti. Bununla birlikte, ETOH grubu ile 5 ng AFB₁/yumurta grubunun civciv çıkış ağırlıkları arasındaki fark önemsizdi ($P>0.05$). Benzer şekilde ETOH grubuyla 7.5 ve 10 ng AFB₁/yumurta gruplarının civciv çıkış ağırlıkları da birbirine oldukça yakın bulundu ($P>0.05$). Civciv çıkış ağırlıkları değeri tek başına yeterli bilgi vermediğinden, civciv çıkış ağırlığının yumurta ağırlığına yüzde oranını ifade eden rölatif civciv ağırlıkları da hesaplandı. Bu değerlerin

karşılaştırılmasında kontrol ve delinip-kapatılan grupların rölatif civciv çıkış ağırlıkları birbirine yakın ($P>0.05$) iken, ETOH ve 5 ng AFB₁/yumurta gruplarının değerleri arasındaki fark önemsizdi. Benzer şekilde 7.5 ve 10 ng AFB₁/yumurta gruplarının rölatif civciv çıkış ağırlıkları arasında da önemli fark bulunmadı ($P>0.05$). Bununla birlikte, son iki grubun rölatif civciv ağırlıkları diğer gruplarındakinden önemli derecede düştü ($P<0.05$).

İstatistiki analizler, kontrol grupları ile %30 ETOH grubunun mortaliteleri arasındaki farkın önemli olmadığını ortaya koydu ($P>0.05$). 10 ng/yumurta AFB₁ verilen grubun mortalitesi, %30 ETOH verilen grubunkinden yüksek olmakla birlikte; gruplar arasındaki fark, istatistiksel öneme sahip değildi.

Tartışma ve Sonuç

Kanatlılarda, memelilerdeki gibi bir fetal-maternal ilişki bulunmamasıyla birlikte, yemlerle alınan AF'in belirli miktarları kanatlı dokularına ve yumurtaya geçtiğinden (Sudhakar, 1992; Oliveira ve ark., 2000), yumurtadaki AF kanatlıların embriyonik gelişmelerinde ciddi problemlere yol açmaktadır. Yumurtaya geçen AFB₁, özellikle kuluçkanın erken dönemlerinde yüksek oranlarda embriyonik ölümlere ya da embriyonik gelişme geriliğine yol açmaktadır (Cilieviç ve ark., 1980; Çelik ve ark., 2000a; Sur, 2001). Yapılan hesaplamalar, yumurtaya geçiş oranının 1/2000-1/2500 arasında olduğunu ortaya koymaktadır (Hamilton, 1982). Geçiş oranı 1/2000 ve Tarım, Orman ve Köy İşleri Bakanlığı'nın konuyla ilgili tebliğiyle (1997) ülkemizde karma yemlerde bulunmasına izin verilen total aflatoksin düzeyleri (50 mg/kg veya 50 ppb yem) ve AFB₁ düzeyi (20 mg/kg yem veya 20 ppb) dikkate

Tablo 2. Grupların yumurta ağırlıkları, infertilite ve mortaliteleriyle civciv çıkış ağırlıkları ve civciv çıkış ağırlığının yumurta ağırlığına oranları (%).

GRUPLAR n=60	Yumurta ağırlıkları	İnfertil yumurta sayısı	İnfertilite (%)	Ölü embriyo Sayısı	Mortalite (%)	Civciv çıkış ağırlığı	Rölatif civciv ağırlıkları (%)
Kontrol	62.93±3.15	4	6.66	2	3.57	42.90±0.56 ^a	68.17±1.32 ^a
Delinip-kapatılan	64.15±3.10	2	3.33	4	6.89	42.39±0.27 ^a	66.07±2.23 ^a
ETOH	61.67±3.26	3	5.00	7	12.28	37.54±1.09 ^{bc}	60.87±1.86 ^b
5ng AFB ₁ /yumurta	64.33±2.96	5	8.33	23	41.81	38.46±0.80 ^b	59.78±2.11 ^b
7.5 ng AFB ₁ /yumurta	65.50±3.02	3	5.00	37	64.91	34.94±0.26 ^c	53.34±1.86 ^c
10 ng AFB ₁ / yumurta	65.04±3.53	5	8.33	45	81.81	35.09±0.72 ^c	53.95±2.13 ^c

a-c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($P<0.05$).

alınarak yapılan hesaplama sonuçları, bu düzeylerde AFB₁ ve total aflatoksinle kontamine olan yemden günde 130 gr yem tüketerek gün aşırı yumurtladığı varsayılan bir tavuğun yumurtasında bulunması muhtemel toplam AF düzeyinin 6.5 ng/yumurta olduğunu göstermektedir (Hamilton, 1982; Çelik ve ark., 2000a). Tavuk Embriyotoksikite Testi-I (Chicken Embriyotoxicity Screening Test-I, CHEST-I) ile total aflatoksin için tavuk embriyolarında belirlenmiş olan embriyotoksik doz sınırları 0,3-30 ng AFB₁/yumurta arasındayken, teratojenik doz sınırı 3-30 ng AFB₁/yumurta'dır (Jelinek ve Peterka, 1985). Bu sonuçlar, yemlerde bulunmasına izin verilen düzeylerde bile, yumurtada embriyotoksik düzeyde AF bulunabileceğini göstermektedir. Saha tarama çalışmaları (Kaya ve ark., 1990; Nizamlioğlu, 1996; Oğuz ve Kurtoğlu, 2000) sonuçları ise, broiler yemlerindeki AF düzeylerinin 5-100 mg/kg yem (5-100 pbb) aralığında değiştiğini ortaya koymaktadır. Yukarıdaki nedenlerle bu çalışmada uygulanan en düşük AFB₁ dozu 5 ngAFB₁/yumurta olarak seçilmiştir.

Aflatoksinlerin etki mekanizması üzerinde yapılan çalışmalarda, doğada en yaygın olarak bulunan ve en tehlikeli olan aflatoksin türünün AFB₁ olduğu belirlendiğinden, etki mekanizması en detaylı biçimde aydınlatılmış olan aflatoksin de AFB₁'dir (Busbee ve ark., 1990; Leeson ve ark., 1995). Bu toksin, karaciğerde sitokrom P-450'ye bağımlı (keçilerde P-448) karma işlevli oksidaz (mixed function oxidase, MFO) enzim sistemiyle daha sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik özelliğe sahip olan epoksit türevlerine (AFB₁-8,9-epoksit) dönüştürülmektedir (Leeson ve ark., 1995). Bu maddeler ise hücredeki nükleo proteinler ve nükleik asitlerle tepkimeye girerek protein sentezini bloke ederler (Neldon-Ortiz ve Qureshi, 1992). Çelik ve ark (2000a), AFB₁'in çok iyi bilinen sitotoksik etkisinin, yapısındaki bifuran halkasının DNA'nın N7-guanin bölgesine bağlanarak DNA'nın biyokimyasal işlevlerini değiştirmek, RNA ve sonuç olarak da protein sentezini bloke etmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Samarajeewa ve ark., 1990). Bu görüşü, kanatlılarda hepatosit yıkımlanmasını gösteren enzimlerdeki önemli artışlar ile hepatositlerin sentezlediği maddeler ya da bunların metabolitleri olan serum total protein, lipid, kolesterol, albümin, amino asit, üre ve Vit. A ile koagülasyon faktörlerinin seviyelerindeki düşüşlerin gösterildiği yedirme denemeleri sonuçları desteklemektedir (Kubena ve ark., 1993; Keçeci ve ark., 1998). AFB₁, hepatotoksik etkisinin yanında nefrotoksik etki de göstermekte ve Ca-P metabolizmasını da bozmaktadır (Glahn ve ark., 1990 ve 1991; Bilgiç ve Yeşildere, 1992, Öznurlu, 2003).

Yukarıdaki bilgilere ek olarak, kanatlı embriyosunda AFB₁'in metabolize edilmesi, karaciğer ve böbreklerin aktive oldukları, embriyonik dönemin 5-6. günlerinden sonra başlamaktadır (Hamilton, 1982). Kuluçka başlangıcında verilen AFB₁'in şiddetli embriyotoksik etkilerinin olduğunun gösterilmesi (Çelik ve ark., 2000a; Sur ve Çelik, 2003) bu molekülün metabolize edilmeden de güçlü embriyotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. AFB₁'in embriyonik hücreler üzerindeki etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmamış ise de, nispeten orta dozda AFB₁ enjeksiyonu yapılan yumurtalarda diskus embriyonalisin area pellucidasinın dışı doğru fıtıklaşmasıyla karakterize olan bir erken embriyonik gelişme anomalisi tespit edilmiş (Çelik ve ark., 2000a; Sur ve Çelik, 2003) ve bu bulguya dayanılarak AFB₁ molekülünün, DNA'ya bağlanarak embriyonik hücrelerin diferansiyasyonunu bozmak suretiyle erken embriyonik gelişme bozukluklarına neden olabileceği ileri sürülmüştür (Çelik ve ark., 2000a; Sur ve Çelik, 2003).

Bu çalışmada, deney gruplarının civciv çıkış ağırlıkları ile rölatif civciv ağırlıklarının, kontrol grubunun değerlerinden önemli derecede ($P<0.05$) düşük olduğu; yüksek doz gruplarında düşüşlerin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Benzer şekilde Öznurlu (2003) da aflatoksin verilen yumurtalarda gelişen embriyo ve civcivlerin tibia uzunlukları ve tibia ağırlıklarında önemli azalmaların ortaya çıktığını bildirmiş ve bu durumun, genel vücut gelişiminde ortaya çıkan gerilemenin bir sonucu olarak, hayvanların genel iskelet sistemi gelişiminin de yavaşlamasından kaynaklandığını ileri sürmüştür.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara dayanılarak; kuluçkalık yumurtalarda bulunan AFB₁'in, diğer zararlı etkileri yanında embriyonik gelişmeyi de bastıradığından, civciv çıkış ağırlığında düşüşlere yol açtığı ve kuluçka randımanı ve civciv kalitesinde önemli düşüşlere neden olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, kuluçka randımanı ve civciv kalitesindeki düşüşlerin nedenleri araştırılırken, yemdeki AF düzeylerinin de dikkate alınmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- Bilgiç, HN. ve Yeşildere, T. (1992). Civcivlerde deneysel Aflatoksinosisde böbrek lezyonları. *İ.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 18, 2, 102-108.
- Busbee, DL., Norman, JO. and Ziprin, RL. (1990). Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B₁ and benzo(a)pyrene. *Arch. Toxicol.*, 64, 285-290.
- Cilievici, O., Ghidus, ICE., Moldovan, A. (1980). The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B₁ on the chick embryo

development. *Morphol.Embryol.*, 4, 309-314.

Çelik, İ., Demet, Ö., Dönmez, H.H., Oğuz, H. and Boydak, M. (1996). Determination of phagocytic and candidacidal activities of peritoneal macrophages isolated from chickens fed with aflatoxin and an aflatoxin adsorbing agent, polyvinylpyrrolidone. *J. Vet. Sci.*, 12, 145-151.

Çelik, İ., Oğuz, H., Demet, Ö., Boydak, M., Dönmez, H.H., Sur, E. and Nizamlioğlu, F. (2000a). Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999. *Br.Poult.Sci.*, 41, 4, 401-409.

Çelik, İ., Oğuz, H., Demet, Ö., Dönmez, H.H., Boydak, M. and Sur, E. (2000b). Efficiency of polyvinylpyrrolidone in reducing immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. *Br. Poult. Sci.*, 41, 4, 430-439.

Glahn, RP., Beers, KW. and Bottje, WG. (1990). Altered renal function in broilers during aflatoxicosis. *Poult. Sci.*, 69, 1796-1799.

Glahn, RP., Beers, KW., Bottje, WG., Wideman, RF., Huff, WE. and Thomas, W. (1991). Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium and vitamin D metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 34, 309-321.

Hamilton, P.B. (1982). Mycotoxins and farm animals. *Refush Veterinary*, 39:17-45.

Jelinek, R. and Peterka, M. (1985). Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian Exp. Biol.*, 23, 588-595.

Kaya, S. (1982). Süt yemi ve çiğ sütte aflatoxin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 29, 443-455.

Kaya, S., Yavuz, H. ve Akar, F. (1990). Bazı yağlı tohum küspelerinde mikotoksin kalıntıları. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 37, 173-180.

Keçeci, T., Oğuz, H., Kurtoğlu, V. and Demet, Ö. (1998). Effects of polyvinyl-pyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.*, 39, 452-458.

Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D. and Clement, BA. (1993). Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 72, 651-657.

Leeson, S., Diaz, G. and Summers, J.D. (1995). Aflatoxins. In: *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*, Eds. Leeson, S., Diaz, G. and Summers, J.D., 248-279. University

Books. P.O. Box. 1326, Guelph, Ontario N1H 6N8, Canada.

Neldon-Ortiz, D.L. and Qureshi, M.A. (1992). The effects of direct and microsomal activated aflatoxin B₁ on chicken peritoneal macrophages in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 31, 61-76.

Nizamlioğlu, F. (1996). Mikotoksin şüphesiyle laboratuara getirilen yem ve yem hammaddelerinde aflatoxin B₁, B₂, G₁ ve G₂ araştırılması. *Veterinarium*, 7: 42-45.

Oğuz, H. ve Kurtoğlu, V. (2000). Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.*, 41: 512-517.

Oliveira, C.A.F., Kobashigawa, E., Reis, T.A., Mestieri, L., Albuquerque, R. and Corrêa, B. (2000). Aflatoxin B₁ residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Add. Cont.*, 17,6, 459-462.

Öznurlu, Y. (2003). Yumurtaya verilen Aflatoxin B₁'in etçi piliçlerin kemik dokularının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. Doktora tezi, S.Ü. Sađ.Bil. Enst., Konya.

Özpinar, H., Özpinar, A. ve Şenel, HS. (1988). Marmara bölgesi yem fabrikalarından alınan kanatlı karma yemleri ve yem hammaddelerinin aflatoxin ve okratoksin A yönünden incelenmesi. *İ.Ü.Vet. Fak. Derg.*, 14,2, 11-18.

Samarajeewa, U., Sen, AC., Cohen, MD. and Wei, C. (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J. Food Prot.*, 53,6, 489-501.

Sudhakar, B.V. (1992). The carry-over effect of aflatoxin B₁ into eggs and liver of chicken. *Indian Vet. J.*, 69:1061-1062.

Sur, E. (2001). Yumurtaya Verilen Aflatoxin B₁(AFB₁)'in Tavukların Lenfoid Organlarının Embriyonal gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. Doktora Tezi, S.Ü. Sađ. Bil. Enst., Konya.

Sur, E. ve Çelik, İ. (2003). Effects of aflatoxin B₁ on the development of bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *Br. Poult. Sci.*, 44,4, 558-566.

Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı (1997). Aflatoxin kontrolüne dair tebliğ, Resmi Gazete, 16 Kasım 1997 tarihli mükerrer yazı.