

TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

SAĞLAM KABUKLU FINDIKTA *ASPERGİLLUS flavus* GELİŞİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ece ÇELİKER GÜL

VAN-2007

TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

SAĞLAM KABUKLU FINDIKTA *ASPERGİLLUS flavus* GELİŞİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ece ÇELİKER GÜL
DANIŞMAN: Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER

VAN-2007

ÖZET

SAĞLAM KABUKLU FINDIKTA *ASPERGİLLUS flavus* GELİŞİMİ

ÇELİKER GÜL, Ece

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER

Ocak 2007, 49 sayfa

Bu çalışmada, sağlam kabuklu ve iç fındıkta %96 Nisbi Rutubet ortamda ve 28 °C’de *A.flavus* gelişimi incelendi. Bu amaçla, kara fındık ve tombul fındık olmak üzere kabuk kalınlıkları farklı iki tür fındık *A.flavus* sporlarıyla 10⁵ cfu/fındık düzeyinde inokule edildi, kabuklu ve iç tane olarak %96 NR ortamda 28 °C’de depolandı. Aynı zamanda inokule edilmemiş kontrol grupları oluşturuldu. Fındıklarda *A.flavus* gelişimi tanelerin %2’lik hipoklorid çözeltisiyle yüzey sterilizasyonundan sonra PDA’ya doğrudan ekilmesi ile tayin edildi. İnokule edilmiş iç fındıklarda *A.flavus* gelişimi oranı 1-2 hafta içinde %80-100’e ulaştı. Kabuklu fındıklardan 18. haftaya kadar örnek alındı. Bu grupta 31 depolama örneğinden 7’sinde %4-100 arasında *A.flavus* enfeksiyonu görüldü. Ancak enfeksiyon rasgele bir seyir izledi ve gelişim oranının depolama süresiyle değişimi çok küçük ve istatistiki olarak önemsiz bulundu. Kabuklu ve iç tane kontrol gruplarında *A.flavus* gelişimi 47 depolama örneğinin 3’ünde sadece 1-2 tanede görüldü.

Sonuç olarak *A.flavus* sporları aşılana ve %96 NR ortamda ve 28 °C’de depolanan sağlam kabuklu fındığın kabuğunun iç taneyi *A.flavus* sporlarının gelişiminden korumada önemli ve rijid bir bariyer olduğu kanısına varılmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus flavus*, Gelişim NR.

ABSTRACT

***ASPERGILLUS flavus* GROWTH STRONG CRUSTACEOUS IN HAZELNUT**

ÇELİKER GÜL, Ece

Msc, Food Engineering Science

Supervisor: Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER

February 2007, 49 pages

In this study, *A.flavus* infection of intact unshelled hazelnuts at 96% RH and 28 °C is investigated. For this reason, two species of hazelnut are inoculated with *A.flavus* spores at the level of 10^5 cfu for each hazelnut, as shelled and unshelled then stored at 96% RH, and sampled weekly. Also un-inoculated control groups are performed. Infection of hazelnuts is determined by direct plating kernels on PDA after surface disinfection with 2% hypochlorite solution. % 80-100 of the kernels of inoculated shelled group is infected by *A.flavus* in 1-2 weeks. Unshelled group of hazelnuts were sampled until the end of 18th week. For this group, infection of *A.flavus* is seen at 7 out of 31 storage samples at the rate of 4-100% of the kernels. However, this infection in unshelled storage samples showed a random behavior and the variation of the infection rate versus storage duration was negligible and statistically is not significant. Both in shelled and unshelled control groups *A.flavus* infection is observed at only 1 or 2 kernels at 3 out of 47 storage samples.

As a conclusion, the intact shell of the hazelnut is a very rigid and important barrier, preventing the kernel from infection of *A.flavus* spores when inoculated and incubated at %96 RH and 28 °C.

Key words: RH, *Aspergillus flavus*, infection.

ÖNSÖZ

Ülkemiz için önemli bir tarımsal ihraç ürünü olan fındıkta uygun olmayan hasat, kurutma, depolama yöntemleri ve koşulları nedeniyle, küfler faaliyet göstermekte, fındık ve fındık ürünlerinde önemli kalite kayıplarına neden olmaktadır. Fındıkta küf gelişmesi yaygın olup, insan ve hayvan sağlığı için önemli risk oluşturmaktadır. Küf gelişimi bahçede başlamakta, hasat, yığın halinde bekletme, depolama ve taşıma sırasında da bu artış devam etmektedir. Küflerin uygun sıcaklık ve rutubet ortamında gelişmesiyle mikotoksinler oluşmaktadır.

Fındıkta en sık rastlanan küflerden birisi *Aspergillus flavus*'tur. Aflatoksinler ise *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* türleri tarafından oluşturulan mikotoksinlerdir. Toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktörler nisbi nem, sıcaklık ve mekanik hasarlardır. Bu çalışma ile 2004 yılı Eylül-Ekim ayları arasında hasat edilen, Giresun Karası ve Tombul fındık olmak üzere iki çeşit fındık örneğinde, %96 nisbi nem ortamında fındık kabuğunun ve kalınlığının *A. flavus*'un iç fındığa penetrasyonunda bir engel olup olmadığı araştırılmaya çalışılmıştır.

Bu araştırmada bana her türlü olanağı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER'e; denemede kullandığım materyalleri bulmama yardımcı olan Dr. A.Cumhur DÜLGER'e; TUBİTAK MAM personeli Uzm. Bio. Ceyda PEMBEÇİ'ye ve verdiğim tüm kararlarda yanımda olan eşim Ali GÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Ece ÇELİKER GÜL

VAN- 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	2
2.1. Fındık Hakkında Genel Bilgiler	2
2.2. Fındığın Genel Özellikleri ve Bilinen Fındık Çeşitleri	3
2.2.1. Fındığın bileşimi	3
2.2.2. Türkiye’de yetiştirilen fındık çeşitleri	3
2.3. Fındığın Kullanım Alanları	4
2.4. Fındıkta Küf Kontaminasyonu	4
2.5. Küfler ve Mikotoksin Oluşumu	5
2.6. Aflatoksinler	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	10
3.1. Materyal	10
3.1.1. Fındık üretim ve depolama bölgesinden <i>A. flavus</i> izolasyonu için kullanılan materyal	10
3.1.2. Fungal penetrasyon denemesinde kullanılan fındıklar	10
3.1.3. Toksijenik <i>A. flavus</i> suşu	11
3.2. Yöntem	11
3.2.1. Fındıklardan sağlam kabuklu olanların ayrılması	11
3.2.2. Fındık çeşitlerinde ortalama tane ağırlığının belirlenmesi	12
3.2.3. Toprak örneklerinde <i>A. flavus</i> aranması	12
3.2.4. Fındık örneklerinde <i>A. flavus</i> aranması	12
3.2.5. <i>A. flavus</i> kültürünün geliştirilmesi	13
3.2.6. <i>A. flavus</i> kültürünün spor üretimi için çoğaltılması	13
3.2.7. İnokülasyonda kullanılacak spor süspansiyonunun hazırlanması	13

3.2.8. Süspansiyonda spor yoğunluğunun direk mikroskopik sayımla belirlenmesi	13
3.2.9. Süspansiyonda spor yoğunluğunun kültürel sayımla belirlenmesi	14
3.2.10. Fındıkların spor süspansiyonu ile inokülasyonu	14
3.2.10.1. İnoküle edilecek fındıklar için kullanılacak süspansiyon miktarının hesaplanması	14
3.2.10.2. Fındıkların spor süspansiyonu ile inokülasyonu	14
3.2.11. % 96 Su aktivitesi solüsyonunun hazırlanması	15
3.2.12. Fındıkların % 96 nisbi rutubette depolanması	16
3.2.13. Başlangıç anı fındık örneklerinde yüzey florasının tayini	17
3.2.14. Depolanan fındıklarda funguslarla enfekte tane oranının belirlenmesi	19
3.2.14.1. Yüzey sterilizasyonu için sodyum hipoklorit çözeltisinin hazırlanması	19
3.2.14.2. İç fındıklarda yüzey sterilizasyonu	19
3.2.14.3. Kabuklu fındıklarda yüzey sterilizasyonu	20
3.2.14.4. Fındık örneklerinin tane halinde ekimleri	20
3.2.14.5. Enfekte tane oranının belirlenmesi	21
3.2.15. A. flavus grubu fungusların teşhisi	21
4. BULGULAR	24
4.1. Yöreden a. Flavus İzolasyonu Amaçlı Alınan Toprak Örneklerinde Kültürel Sayım Sonuçları	24
4.2. Yöreden A. flavus İzolasyonu Amaçlı Alınan Fındık Örneklerinde Kültürel Sayım Sonuçları	24
4.3. Kara Fındık ve Tombul Fındıkta Tane Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı	24
4.4. Depolama Denemesi Boyunca Fındıklarda Enfekte Tane Oranında Değişim	27
4.4.1. İç fındıklarda A.flavus gelişimi oranları	27
4.4.2. Kabuklu fındıklarda depolama boyunca toplam fungal kolonizasyon ve A. flavus kolonizasyonunun değişimi	28
4.4.2.1. Kabuklu fındıklarda A.flavus kolonizasyonunun depolama süresince değişimi	28
4.4.2.2. Kabuklu fındıklarda fungal kolonizasyonun depolama süresince değişimi	33
4.4.3. Depolanan kabuklu fındıklarda depolama başlangıcında ve sonunda yüzeyde toplam fungus ve A.flavus düzeyleri	34
4.4.4. Depolama denemesi boyunca fındıklarda ağırlık değişimi	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
KAYNAKLAR	46
ÖZ GEÇMİŞ	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Fındık tanesinin ağaçtaki görünümü	2
Şekil 3.1. Fındıkların toksijenik <i>A.flavus</i> suşu içeren spor süspansiyonu ile inokülasyonu	15
Şekil 3.2. Kabuklu fındıkların %96 nisbi rutubette depolanması	17
Şekil 3.3. İç fındıkların %96 nisbi rutubette depolanması	17
Şekil 3.4. Aşılınmamış kabuklu kara fındıkta yüzey florası ekim sonuçları	18
Şekil 3.5. Aşılınmamış tombul iç fındıkta yüzey florası ekim sonuçları	18
Şekil 3.6. Aşılınmış kabuklu kara fındıkta yüzey florası ekim sonuçları	19
Şekil 3.7. Fındık örneklerinin tane halinde ekimleri	20
Şekil 3.8. Aşılınmış tombul iç fındıkta <i>A.flavus</i> gelişimi	22
Şekil 3.9. <i>A.flavus</i> gelişiminin konidial görünümü	22
Şekil 3.10. <i>A.flavus</i> gelişiminin mikroskopta incelenmesi	23
Şekil 4.1. Kabuklu kara fındıkta ağırlık dağılımı	25
Şekil 4.2. Kabuklu tombul fındıkta ağırlık dağılımı	25
Şekil 4.3. Kara iç fındıkta ağırlık dağılımı	26
Şekil 4.4. İç tombul fındıkta ağırlık dağılımı	26
Şekil 4.5. Kabuklu kara fındıklarda <i>A.flavus</i> ile inokülasyondan sonra depolama sürecinde <i>A.flavus</i> 'la enfekte tane oranında değişme	30
Şekil 4.6. Kabuklu tombul fındıklarda <i>A.flavus</i> ile inokülasyondan sonra depolama sürecinde <i>A.flavus</i> 'la enfekte tane oranında değişme	31
Şekil 4.7. İnoküle edilmemiş kabuklu kara fındıkta ağırlık değişimi(%)	37
Şekil 4.8. İnoküle edilmemiş kabuklu tombul fındıkta ağırlık değişimi(%)	37
Şekil 4.9. İnoküle edilmemiş kara iç fındıkta ağırlık değişimi(%)	38
Şekil 4.10. İnoküle edilmemiş tombul iç fındıkta ağırlık değişimi(%)	38
Şekil 4.11. İnoküle edilmiş kabuklu kara fındıkta ağırlık değişimi(%)	39
Şekil 4.12. İnoküle edilmiş kabuklu tombul fındıkta ağırlık değişimi(%)	39
Şekil 4.13. İnoküle edilmiş kara iç fındıkta ağırlık değişimi (%)	40
Şekil 4.14. İnoküle edilmiş tombul iç fındıkta ağırlık değişimi (%)	40
Şekil 4.15. Depolamaya yeni konulan bir kavanoz	41
Şekil 4.16. Depolama süresince tel file içindeki fındıkların yüzeyinde gelişen koloniler	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Türkiye Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Enstitüsü Marmara Araştırma Merkezi Kültür Koleksiyonundan temin edilen saf <i>A. flavus</i> kültürlerinin kimlik bilgileri	11
Çizelge 3.2. Belli konsantrasyondaki NaCl çözeltilerinin su aktiviteleri	16
Çizelge 4.1. Denemede kullanılan kabuklu ve iç fındıklarda ortalama, standart sapma ve değişim katsayıları	27
Çizelge 4.2. <i>A. flavus</i> sporları ile inoküle edilmiş ve edilmemiş fındıkların %96 NR sağlayan çözelti üzerinde 2 hafta depolaması sonucu <i>A. flavus</i> ile enfekte olan tanelerin oranları	28
Çizelge 4.3. İç fındıklarda depolama sırasında <i>A. flavus</i> ile enfekte tane artışı	28
Çizelge 4.4. Kabuklu fındıklarda depolama boyunca gelişen (iç tanede) <i>A. flavus</i> kolonizasyonunun değişimi	29
Çizelge 4.5. Kabuklu fındıklarda toplam <i>A. flavus</i> enfeksiyonu üzerine inokülasyon, depolama süresi ve çeşidin etkisine ait varyans analizi	30
Çizelge 4.6. Kabuklu tımbul fındıklarda <i>A. flavus</i> ile inokülasyondan sonra depolama sürecinde <i>A. flavus</i> 'la enfekte tane oranında değişim	32
Çizelge 4.7. Kabuklu fındıklarda <i>A. flavus</i> enfeksiyonunun %7.5 NaCl içeren PDA ile belirlenen düzeyi üzerine <i>A. flavus</i> inokülasyonu, depolama süresi ve fındık çeşidinin etkisine ait varyans analizi tablosu	32
Çizelge 4.8. Kabuklu fındıkların depolama süresi içinde tanelerde toplam fungal gelişimde değişimi (PDA'da gözlenen)	33
Çizelge 4.9. Kabuklu tanelerde depolama süresince toplam fungal gelişimde değişim	33
Çizelge 4.10. Kabuklu fındıkların depolama süresi içinde tanelerde depo fungusu gelişiminde değişimi (%7.5 NaCl içeren PDA'da gözlenen)	34
Çizelge 4.11. Denemede kullanılan fındıklarda yüzey fungal yükü	35
Çizelge 4.12. Deneme başlangıcında aşılana fındıklarda yüzeyde <i>A. flavus</i> yükü	35
Çizelge 4.13. Depolama sonunda kabuklu fındıkların yüzeyinde toplam küf yükü	36
Çizelge 4.14. Depolama sonunda kabuklu fındıkların yüzeyinde <i>A. flavus</i> yükü	36

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

a_w	su aktivitesi
Cfu	koloni oluşturan birim
cm	Santimetre
dk	dakika
g	gram
kg	kilogram
kob	koloni oluşturan birim
lt	litre
mg	miligram
ml	mililitre
μg	mikrogram
nm	nanometre
ppb	$\mu\text{g}/\text{kg}$
ppm	mg/kg

Kısaltmalar

AFB ₁	Aflatoksin B ₁
AFB ₂	Aflatoksin B ₂
AFG ₁	Aflatoksin G ₁
AFG ₂	Aflatoksin G ₂
AFM ₁	Aflatoksin M ₁
AFM ₂	Aflatoksin M ₂
FTS	Fizyolojik tuzlu su
Kf	Kara fındık
NR	Nisbi rutubet
PDA	Potato dekstroz agar
RH	Relative humidity
Tf	Tombul fındık
UV	Ultra viyole

1. GİRİŞ

Küfler birçok gıda maddesinde ve özellikle kurutulmuş muhafaza edilen tarımsal ürün ve gıdalarda en önemli bozulma etmenidir.

Küflerin faaliyetine maruz kalan tarımsal ürünlerde, gözle görülür kayıplar oluşmakta ve bundan çok daha önemli olarak bazı türlere ait funguslar ürettikleri mikotoksinler ile gıdaları kontamine etmektedirler (Çoksöyler, 1987).

350'den fazla fungus türünün mikotoksin yaptığı ve 300'den fazla mikotoksin varlığı bilinmektedir. Aflatoksinler ise esas olarak *Aspergillus flavus* tarafından oluşturulan bir grup mikotoksinin genel adıdır ve üzerinde en çok çalışılan mikotoksinlerdir (Betina, 1989).

Türkiye'nin çok önemli ihracat ürünleri olan fındık, incir ve Antep fıstığı 1970'li yıllarda aflatoksin sorunu ile karşılaşmıştır.

Fındık Türkiye'nin en önemli tarımsal ürünlerinden birisidir. Türkiye'de yılda ortalama 600 bin ton kabuklu fındık üretilmektedir. Fındıkta aflatoksin problemi 1967 yılından bu yana önemli ihracat kayıplarına neden olmaktadır (Heperkan, 2003).

Fındıkta aflatoksin oluşumunun engellenmesi ülke ekonomisi için büyük önem taşımaktadır. 1970'li yıllardan bu yana bu alanda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Genel olarak fındığın harmanda iyi ve kısa sürede kurutulması, depolamanın kuru ve serin bir ortamda yapılması toksin oluşumunu çok önemli ölçüde engelleyecektir. Bu arada fındık kabuğunun da, toksin oluşturan fungusun iç kısma geçmesinde önemli bir engel oluşturacağı açıktır. Eke ve Göktan (1987) tarafından yapılan bir çalışmada sağlam kabuklu fındıklarda *Aspergillus flavus*'un iç kısımda bulunamayacağı belirtilmiştir. Buna karşın Özkaya ve Çoksöyler (1987), tarafından yapılan bir çalışmada ise %100 Nisbi Rutubetli ortamda *Aspergillus flavus*'un sağlam kabuklu fındıkta da kabuğu geçerek iç kısmı enfekte ettiği gösterilmiştir. Ancak pratikte bu yükseklikte nisbi rutubet sadece depoda suyun göllendiği, duvarlardan suların aktığı gibi çok eksterm durumlarda söz konusudur.

Bu nedenle benzeri denemelerin fungusların kolaylıkla gelişebildiği ama %100 gibi doymuş bir nem ortamında biraz daha düşük bir ortamda yapılması daha yararlı olacaktır.

Bu çalışmada kabuklu fındıklarda *Aspergillus flavus*'un iç taneyi enfekte edip etmediği incelenmiştir. *Aspergillus flavus*'un gelişebileceği depo koşulları sağlanarak, sağlam kabuklu fındık ile iç fındıkta küf gelişimi gözlenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1. Fındık Hakkında Genel Bilgiler

Anavatanı Anadolu olan fındığın (*Corylus avellana* L.), yetiştiriciliği ülkemizde yaklaşık 2500 yıldan bu yana yapılmaktadır.

İlk fındık bahçesinin ne zaman kurulduğu kesin olarak bilinmemekle birlikte halk arasında yaygın olan görüşe göre Akçakoca'ya ilk fındık fidesini 1900 yılında Osmaniye Mahallesi'ne yerleşen Trabzon'lu tüccar Ahmet Efendi getirmiştir. Bundan sonra fındık fidesi Batum göçmenlerinden Hocaoğlu Ömer Efendi tarafından getirilmiştir. Daha sonraları Mehmet Arif adındaki bir göçmen fındığın iyi bir geleceğinin olacağını düşünmüş ve kendi adı verilen fındık türünde bol miktarda fındık fidesi getirip kendi bahçesine dikmiştir. Mehmet Arif adı verilen fındık yağlı fındık türüdür (Anonim, 2003).



Şekil 2.1. Fındık tanesinin ağaçtaki görünümü

Karadeniz Bölgesinin iklim özellikleri, fındık için en ideal ortamı oluşturur. Fındık, kış aylarında çiçeklenen ve döllen tek bitkidir. Dişi çiçeklerin çanak yaprakları "çotanak" adı verilen fındık kadehini oluşturur. Fındığın çeşitli türleri vardır. Ülkemizdeki kültür fındıkları 5-6 metre boylanabilmekte olup '*Corylus Avellana*' ile '*Corylus Maxima*' türlerinin melezleridir. Ağustos ayında olgunlaşan fındıklar toplanıp kurutulduktan sonra, Eylül ve Ekim aylarında pazara getirilip satışa çıkarılır.

Yeryüzünde, 36°-41° kuzey enlemlerinde ve kendine özgü iklim koşullarında yetişen fındık ağacı, kıyılardan en çok 30 km içerde ve yüksekliği 750-1000 metreyi geçmeyen yerlerde ürün verir. Türkiye, İtalya, İspanya ve Amerika fındık yetiştirilen başlıca ülkelerdir. Türkiye 450 000 ton civarındaki fındık üretimi ile dünya fındığının %73'ünü üretmekte ve üretimin %83'ünü ihraç ederek yaklaşık yılda 1 milyar dolar döviz elde etmektedir. Fındık üretiminde Türkiye'yi İtalya (110 000 ton/yıl), Amerika (25 000 ton/yıl) ve İspanya (18 000 ton/yıl) izlemektedir (Anonim, 2004).

Ülkemizde fındık Karadeniz Bölgesinde başlıca Giresun, Rize ve Ordu illerinde, batıda da Sakarya ve Bolu illerinde üretilmektedir (Tosun, 1988).

2.2. Fındığın Genel Özellikleri ve Bilinen Fındık Çeşitleri

2.2.1. Fındığın bileşimi

Fındık; kimyasal olarak %4,6 nem, %16,2 protein, %62,7 yağ, %4,7 selüloz, %14,3 karbonhidrat, %2,2 kül, vitamin içeriği olarak %0,3 B1, %0,12 B2, %1,75 niasin, %0,24 B6, %31,4 E vitamini, mineral madde olarak %5,8 demir, %160,0 kalsiyum, %2,2 çinko, %655,3 potasyum, %2,1 sodyum, %161,2 magnezyum %1,3 bakır ve %5,1 manganez içerir.

Fındık insan vücuduna yararlı karbonhidrat, protein ve yağ ile metabolizmayı düzenleyen B grubu vitaminler yönünden de zengin bir kaynaktır. Beslenme uzmanları genel olarak günlük beslenmede fındık ve fındık ürünlerine daha fazla yer verilmesini önermekte, özellikle çocuklar, gençler, sporcular, askerler ve işçiler için büyük enerji kaynağı olduğunu belirtmektedirler (Açkurt, 1996).

2.2.2. Türkiye'de yetiştirilen fındık çeşitleri

Türk fındığı, kalite olarak Giresun ve Levant olmak üzere ikiye ayrılır:

Giresun kalite fındık, tadı ve içerdiği yağ oranı ile yeryüzünün en üstün özellikli fındığıdır. Giresun ile Trabzon'un Beşikdüzü, Vakfıkebir, Çarşıbaşı ve Akçaabat ilçelerinde yetişir.

Levant kalite fındık, daha az yağ içerir. Trabzon ve bir bölümü ile Ordu, Samsun, Bolu, Sakarya, Zonguldak ve Bartın illerinde yetişir. Yaklaşık 5 bin yıldır tanınıp bilinen fındık, üç ana gruba ayrılır:

Kabuklu Tombul Fındıklar: Tombul, Palaz, Mincane, Gök, Kalınkara, Kan, Cavcava ve Delisava (Çakıldak)

Kabuklu Sivri Fındıklar: Sivri, İncekara, Kuş.

Diğer Kabuklu Fındıklar: Badem, Foşa, Kargalak, Ordu İkizi (Anonim, 2004)

2.3. Fındığın Kullanım Alanları

Önceleri kuruyemiş olarak tüketilen fındığın, gıda sanayiinin gelişmesiyle birlikte kullanım alanı oldukça genişlemiştir. Fındık; çikolata, bisküvi, şekerleme, tatlı, pasta, dondurma imalatında yardımcı malzeme olarak kullanılmaktadır. Çikolata ve bisküvi imalatında, dünyanın yıllık iç fındık tüketimi 300 000 ton'u aşmıştır.

Fındık, dünyada bademden sonra en çok tüketilen kuru meyvedir. Fındık çerezlik olarak tüketildiği gibi, pastacılık ve şekerleme sanayinde geniş ölçüde kullanım alanına sahiptir. Türkiye'de üretilen fındığın %85-90'ı iç ve kabuklu olarak ihraç edilmekte, %10-15'i ise ülke içerisinde çerezlik olarak ve pasta ve şekerleme sanayinde tüketilmektedir (Altay, 1986).

2.4. Fındıkta Küf Kontaminasyonu

Fındıkta küf bulaşması yaygın olup, gelişmeleri insan ve hayvan sağlığı için önemli bir risk oluşturmaktadır. Küf gelişimi bahçede başlamakta, hasat ve yetersiz veya uygun olmayan kurutma koşulları nedeniyle gelişebilmekte, depolama ve taşıma sırasında da bulaşma miktarı artmaktadır.

Fındıkların küf spektrumunda genellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri görülür. Mısır kökenli fındıklarda genellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ek olarak *Eurotium* ve *Cladosporium* türleri de yer alır. Alman gıda endüstrisinden sağlanan fındıklarda, dominant küfler; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* cinsleri ile *Rhizopus stolonifer* görülmüştür (Tunail, 2000).

Türkiye kabuklu fındıklarından yapılan bir çalışmada Karadeniz ve Marmara bölgesinde fındık üreten illerden toplanan 61 numunede başta *A. niger* olmak üzere *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.candidus* türleri ile *Penicillium*, *Trichothecium*, *Rhizopus* ve *Fusarium* türleri izole edildiği belirtilmektedir (Çoksöyler ve ark., 1993).

Kurutma aşamasında hakim flora *Penicillium*, *Trichothecium*, *Eurotium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* cinslerinden oluştuğu ve *Rhizopus*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Alternaria*, *Verticillium* ve *Pestalotiopsis*'e daha az sıklıkla rastlandığı belirtilmektedir. Ayrıca sık rastlanan türlerin ise *P.commune*, *P.brevicompectum*, *P.crustosum*, *P.fellutanum*, *P.canczewskii*, *P.aurantiogriseum*, *Trichothecium roseum*, *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.niger*, *Eurotium spp.*, *Cladosporium spp.* ve *Trichoderma spp.* olduğu ifade edilmektedir (Heperkan, 2003).

2.5. Küfler ve Mikotoksin Oluşumu

Tarımsal ürünler, hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında, ortam koşullarına, tarım ürünlerinin bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak değişik küflerle kontamine olurlar. Küflerle kontaminasyon iki açıdan önemlidir. Yakın zamana kadar tarımsal ürünlerdeki kayıplar, danelerin çimlenme kabiliyetindeki düşüşler nedeniyle, özet olarak ekonomik açıdan önemli görülmüştür. Ancak gıda ve yemlerde gelişen fungusların, gelişme sürecini tamamladıktan sonra miselleri içinde oluşturdukları ve birçok durumda üzerinde buldukları ürüne salgıladıkları toksik metabolitler insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır. Fungusların ürettikleri bu toksik metabolitlere mikotoksin denir (Tunail, 2000).

Tarımın ağırlıklı olduğu ülkemizde iklim koşulları gıda ve ürünlerinde küflerin gelişmesine uygundur. Mevcut depolama tesislerinin yetersizliği, geleneksel işleme ve muhafaza yöntemlerinin birçok bölgede hala sürdürülmesi, küf gelişimine ayrıca ortam yaratmaktadır. Küflerin insanlarda doğrudan sağlık bozucu etkileri yanında birçok gıdada üreyip geliştirdikleri toksik sekonder metabolizma bileşiklerinin neden olduğu hastalıklar, akut veya kronik zehirlenmeler büyük önem taşır (Alperden, 1985).

Toprak, hava, su gibi doğanın her kesitinde yaygın doğal kontaminant olarak bulunan küfler, tarımsal ürünler ve işlenmiş gıdalar için önemli riskler oluşturabilir. Bu riskler kalite bozuklukları ve ürün kayıplarına bağlı ekonomik kayıplar olabildiği gibi, toksik küflerden kaynaklanabilen sağlık sorunları da olabilmektedir. Bazı küfler toksik karakterli olup, üründe

gelişmesini takiben metabolizma ürünleri olan mikotoksinleri üretebilirler. Bu da canlı organizmalarda, çeşitli doku ve organlarda, akut ve kronik hastalıklara neden olabilir ki, kökeni küf toksini olan hastalıklar mikotoksikoz olarak adlandırılmaktadır. Başta karaciğer kanserleri, böbrek, kas, solunum ve sinir sistemi hasarlanmaları en önemli mikotoksikozların örnekleridir (Topal, 1996).

Fındıkta aflatoksin hasat, kurutma, ayıklama ve depolama sırasında yapılan hatalardan dolayı oluşmaktadır. Toksin oluşumunda, hasat öncesi ürünün beslenmesinin yetersiz oluşu zayıf yetişmesine sebep olmakta, böylece bitkiler gerek patojen küf mantarlarının gerekse zararlıların hücumu nedeniyle toksin oluşturan küfler için uygun ortam hazırlamaktadır. Hasat şekli, özellikle ürünün hasat sırasında yaralanması veya zarar görmesi, kabuklu ürünlerin kabuklarının tahrip olması ve hasat ile kurutma arasındaki gecikme toksin oluşumunu teşvik eder (Aluç, 2003).

Bilinen tür sayısı birkaç bine ulaşan küfler, ekolojik istekleri yönünden geniş bir spektrum gösterirler ve kötü koşullara (düşük su aktivitesi gibi) karşı diğer mikroorganizmalara göre daha dayanıklıdırlar. Küflerin gıdalarda meydana getirdikleri bozulmalar, görünüş bozukluğu(küflü görünüş, renk değişmesi), yumuşama, çürüme, ekşime, gibi değişik boyutlarda ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca bazı küf türleri insan ve hayvanlarda toksik ve karsenojenik etki yapan mikotoksinleri salgılamaktadır. Bu bakımdan halk sağlığının korunması yanında küflerin metabolik aktiviteleri neticesinde meydana gelebilecek gıda kayıplarının önlenmesi veya en azından asgariye indirilmesi gıda kalite kontrolünün önemli bir unsurunu teşkil eder (Karapınar, 1984).

Küfler de dahil olmak üzere mikroorganizmaların gıdalar üzerinde üreme ve gelişmelerini etkileyen değişik fiziksel ve kimyasal faktörler vardır. Bu faktörler gıdanın fizikokimyasal yapısına bağlı olan iç faktörler (a_w , pH, O/R potansiyeli, besin elementleri, antimikrobiyal maddeler, biyolojik yapı) ile gıdaların depolandıkları çevre koşullarını kapsayan dış faktörlerden (sıcaklık, nisbi nem, atmosferik kompozisyon) meydana gelir (Karapınar, 1984).

Toksik küfler, uygun koşullar bulduklarında mikotoksinlerini üretirler, bu özellikteki küf türleri gıdanın ve ortamın karakteriyle etkileşim halindedir. Yine mikotoksinler, stabiliteleri ve biyolojik etkinlikleri farklı olan alkaloid, siklopeptid ve kumarin gibi, farklı yapılarda olabilmektedir (Topal, 1996).

Mikotoksinlerin kimyasal yapıları incelendiğinde çoğunun aromatik yapıda olduğu, daha az bir kısmının da alifatik bileşiklerden oluştuğu görülür. Genellikle yüksek sıcaklıklara dirençli olup, mikotoksin çeşidine, sıcaklık derecelerine ve uygulama sürelerine göre farklı

stabilite gösterirler. Çoğu kendilerinin sentezledikleri toksinlerden olumsuz etkilenmez. Bazı mikotoksinler endotoksin olarak misel içinde birikirken, birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülür. Bu nedenle küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırılsa bile ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmaz (Tunail, 2000).

Gıda endüstrisinde gerek kalite ve gerekse hijyen açısından küf florasının yapısı ve miktarı önemli bir ölçüttür. İnsan ve hayvan beslenmesinde temel olan gıda ve yem maddelerinin üzerinde oluşan küfler ekonomik kayıplar neden oldukları gibi, oluşturdukları sekonder metabolizma ürünlerinin toksik etkileri ile sağlık açısından da büyük bir tehlike doğururlar (Topal, 1984).

Mikotoksinler, küfler tarafından oluşturulan ikincil toksik bileşiklere verilen genel isimdir. Mikotoksinlerin bir kısmı gıdalarda kaçınılması imkansız tehlikeler olarak kabul edilmekte, diğer bir kısmı ise hasat, depolama, kurutma işlemleri sırasındaki dikkatli uygulamalar ve diğer teknolojik işlemlerle önlenilmekte veya azaltılabilmektedir. Doğal mikotoksin oluşumu, küflerin hasattan önceki kontaminasyonu ile ilgili olup, mikotoksin miktarı yıldan yıla çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Heperkan, 2003).

İnsan ve hayvan sağlığını tehdit eden mikotoksinler, gıdalardan tamamen elimine edilemeyen doğal kontaminant maddelerdir. Bu nedenle halk sağlığı ile ilgili kurumlar mikotoksinlerin gıdalarda bulunma düzeyleri hakkında düzenleyici kararlar almak zorunda kalmıştır (Boyacıoğlu ve Gönül, 1986).

Gıda maddeleri üzerinde, üretimin başlangıcından tüketildiği ana kadar, şartlar uygun olduğu takdirde, çeşitli küf mantarları gelişip ürün kalitesinde istenmeyen değişikliklere ve bozulmalara sebep olabilirler. Küf mantarları tarafından bozulmuş olan gıda maddelerinin, insan ve hayvanlarda hastalıklara hatta ölümlerle sonuçlanabilen zehirlenmelere yol açmasına rağmen, yakın zamana kadar bu tip bozulmalar daha çok ekonomik yönden ele alınmaktaydı. Bu nedenle gıda maddeleri üzerinde üreyen küflerin mikotoksin adı verilen toksik metabolitleri ile ilgili çalışmalar uzun yıllar ihmal edilmiştir (Aşkın ve Köşker, 1986).

Birçok gıda ve yem maddesi tarlada, ambarda, işlenmeleri veya nakledilmeleri sırasında, başta toprak, hava ve su olmak üzere çeşitli kaynaklardan mikroorganizmalarla bulaşır. Gelişmeleri için uygun nispi nem ve sıcaklık gibi çevre şartlarını bulan mikroorganizmalar çoğalarak toksinlerini veya diğer metabolitlerini oluştururlar. İlgili olarak bu ortamda *Aspergillus flavus* veya *Aspergillus parasiticus* türlerinin bulunmasıyla aflatoksinler de meydana gelebilir (Sert, 1991).

2.6. Aflatoksinler

Tarımsal ürünlerde aflatoksin oluşumu, ilgili fungusların varlığı ve spor yüküne, sıcaklık ve nem gibi ortam şartlarına, bitkinin çeşidine, mekanik hasarların varlığı gibi faktörlere bağlıdır (Hesseltine, 1976).

Aflatoksinler, ilk defa 1960 yılında İngiltere’de bir tavuk çiftliğinde 100 000’den fazla hindinin ölümüne yol açan bir hastalık sonucu ortaya çıkmıştır. O dönemlerde ‘turkey x disease’ adıyla anılan hastalığa, hayvan yemlerine katılan yerfıstığı unlarındaki küflerin neden olduğu saptanmış, yapılan araştırmalarda bu küfün *Aspergillus flavus* olduğu saptanarak ürettiği toksine de aflatoksin denilmiştir. Daha sonraki çalışmalar ile *A. flavus* ile *A. parasiticus* başta olmak üzere diğer bazı küf türlerinin de aflatoksin üretebildiği belirtilmişse de, son bulgulara göre aflatoksin üreten küfler sadece *A. flavus* ve *A. parasiticus*’ tur (Karapınar, Gönül, 2000).

İnce Tabaka Kromatografisi ile yapılan ayırmda toksinin 360 nm UV ışığı altında biri mavi (blue), diğeri yeşil (green) komponent içerdiği görülmüş ve bu iki form; aflatoksin B ve aflatoksin G olarak adlandırılmıştır. Daha sonra her iki fraksiyonun da ikişer bileşen içerdiği görülerek fraksiyonlar aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bulunan aflatoksin türevlerinin sayısı 18’e yükselmiştir (Detroy ve ark., 1971).

Aflatoksinler metanol, kloroform, aseton gibi polar çözücülerde çözünmelerine karşın hegzan, petrol eteri gibi apolar çözücülerde ve suda çözünmezler. Ayrıca aflatoksinler, ultraviyole ışık altında fluoresan özellik gösterirler (Karapınar, 1981).

Aflatoksinler filamentli funguslardan *Aspergillus* cinsine ait üç tür ve iki alt tür tarafından oluşturulur. Bunlar; *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. noimus* türleri ve *A. flavus* var. *Columnaris*, *A. parasiticus* var. *globosus* alt türleridir. *Aspergillus*lar mezofilik karakterli olup 6-8 °C’den 50-60 °C’ye kadar gelişebilirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 35-38 °C’dir. 10-13 °C’nin altında ve 41-42 °C’nin üzerinde aflatoksin oluşumu sınırlanır. En yüksek toksin oluşumuna ise 25-30 °C’lerde ulaşılır. *A. flavus* ve *A. parasiticus* türleri diğer bazı *Aspergillus* türleri ile birlikte kseroofilik küfler içinde yer alır. *Aspergillus*ların optimum gelişmeleri için gereken a_w: 0,97- 0,99 olmakla beraber gelişmelerini a_w: 0,80 değerinin altında da sürdürebilirler. *A. flavus* gelişimi için minimum a_w: 0,78-0,82 değerini ister. Toksin oluşumu için ise minimum a_w: 0,83-0,87 değerine ihtiyaç duyar (Tunail, 2000).

Aspergillus flavus gelişme sıcaklığı yönünden biraz değişkenlik göstermekle birlikte minimum gelişme sıcaklığı 12 °C’ye ve maksimum gelişme sıcaklığı 48 °C’ye yakındır.

Optimum gelişme sıcaklığı 25-42 °C arasında olduğu belirtilmektedir. Minimum gelişmesi için gerekli su aktivitesi 33 °C'de 0.78 olarak verilmiştir. Ayrıca gelişmesi için optimum pH 7.5 olarak belirtilmiştir. *A.flavus*'un yağlı kuru meyveler ve yağlı kuru tohumlara bir substrat olarak ilgisi vardır (Pitt ve Hocking, 1985).

Aflatoksin oluşumunu etkileyen faktörlerin başında bağıl nem oranı gelmektedir. Küfler düşük bağıl nemli ortamda gelişebilme yeteneğine sahiptir. Yalnız küflerin gelişebildikleri en düşük bağıl nem ile toksin oluşturdukları bağıl nem arasında belirgin bir farklılık vardır. Gıda maddelerinin bileşimi, su muhtevası, pH vb. fiziksel ve kimyasal yapı değişiklikleri, bunlar üzerinde sentezlenen aflatoksin miktarının da farklı olmasına yol açmaktadır (Tosun, 1988).

Aflatoksinler yüksek dozda akut olarak etkili olurlar. Daha düşük düzeyleri ise, primer karaciğer kanseri, kalın bağırsak kanseri, siroz hepatitis, akciğer kanseri, reys sendromu gibi kronik hastalıklara neden olduğu belirtilmektedir (Alperden, 1985).

A.flavus ve *A.parasiticus*'un oluşturduğu AFB₁, küflü besinlerin tüketimi ile sindirildiğinde kana geçer. Aflatoksinler hamile kadınların kanında ve anne sütünde bulunurlar. Aflatoksin B₁'in metabolik ürünleri olan AFM₁ ve AFM₂ sütte, idrarda ve dışkıda görülür. Yüksek dozlarda öldürücü etkiye sahip olmalarına rağmen süregen olarak alınan düşük doz kansere, özellikle hepatosellüler karsinom (HCC)'a sebebiyet verir (Özyaral, 2003).

Çeşitli tarımsal ürün ve işlenmiş gıda maddelerinden izole edilen küflerin toksin yapma güçleri üzerinde yapılan araştırmalar, aflatoksinlerin daha ziyade *A. flavus* grubu mikroorganizmalar tarafından meydana getirildiğini belirlemektedir (Aşkın ve Köşker, 1976).

Aflatoksinin önemli bir kanser yapıcısı oluşunun anlaşılmasından sonra birçok ülke bu konu üzerine eğilmiş, gıda maddelerinde aflatoksinler için limitler koymuşlardır. İhraç edilen bazı ürünlerimizin aflatoksin bulunmuş olduğu gerekçesiyle geri gönderilmiş olması, ülkemizde de bu konuya önem kazandırmış ve ilgili çalışmaları başlatmıştır. Ayrıca aflatoksin oluşumuna hassas ve çok tüketilen gıda maddelerinin de halk sağlığını korumak açısından incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır (Çoksöyler ve ark. 1993).

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı tarafından çıkarılan 23 Eylül 2003 tarihli ve 24885 sayılı resmi gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren 'Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkındaki Tebliğ'de; fındık, yerfıstığı ve diğer yağlı kuru meyveler, yağlı tohumlar, incir, üzüm ve kurutulmuş meyveler ve bunlardan üretilmiş gıdalarda maksimum limit AFB₁ için 5 ppb ve toplam aflatoksin için 10 ppb olarak belirlenmiştir (Anonim, 2002).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada iki tip materyal kullanılmıştır. Bunlardan birisi denemede kullanılacak toksijenik *A. flavus* izolasyonu için fındık ve toprak örnekleridir. Diğerisi ise fungal penetrasyon denemesinde kullanılacak fındıklardır.

3.1.1. Fındık üretim ve depolama bölgesinden *A. flavus* izolasyonu için kullanılan materyal

Bu amaçla Giresun'un Görele ilçesinden bahçelerden usulüne uygun olarak (yüzeyinden 5-10 cm'lik bir kısmı kaldırdıktan sonra altta kalan kısımdan kürek ile alınan) örnekler, hiç kullanılmamış polietilen poşetlere konulmuş ve 1 gün (24 saat içinde) içinde laboratuara getirilmiştir. Bu şekilde 15 adet toprak örneği alınmıştır.

Aynı amaçla bahçelerden yere dökülen fındıklardan örnekler alınmıştır. Örnekler her bahçeden yere dökülen fındıklardan 10-15 adet fındık yine hiç kullanılmamış polietilen torbalara konularak aynı gün (24 saat içinde) laboratuara getirilmiştir. Bu amaçla toprak örneği alınan bahçelerden 12 adedinden örnek alınabilmiştir.

3.1.2. Fungal penetrasyon denemesinde kullanılan fındıklar

Bu amaçla Görele'den hepsi aynı bölgenin ürünü olmak üzere kara fındık ve Giresun tombulu olmak üzere kabuk kalınlıkları farklı iki çeşit fındık alınmıştır. Fındıklar Demirci Gıda Sanayi A.Ş.'ye ait Fındık işleme fabrikasının deposundan alınmıştır. Her iki çeşitten 5'er kg. kabuklu fındık alınmış ve bunlar aynı gün (24 saat içinde) laboratuara getirilmiştir.

3.1.3. Toksikjenik *A. flavus* suşu

Bölgeden toksijenik bir *A. flavus* suşu izole edilememesi ihtimaline karşı olarak Türkiye Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Enstitüsü Marmara Araştırma Merkezi Kültür Koleksiyonundan (Gebze/Kocaeli) fındıktan izole edilmiş toksijenik iki *A. flavus* saf kültürü temin edilmiştir. Kültürlere ait kimlik bilgileri aşağıda çizelge halinde verilmiştir.

Çizelge 3.1. Türkiye Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Enstitüsü Marmara Araştırma Merkezi Kültür Koleksiyonundan temin edilen saf *A. flavus* kültürlerinin kimlik bilgileri

Bilgiler	1. Kültür	2. Kültür
İzolatin ismi	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
İzolatin alındığı örnek	Fındık	Fındık
İzolatin alındığı Şehir/Bölge	Karadeniz (A-15, 10-1/3A)	Karadeniz (21-18, 5-1/5A)
Liyofilize Kod No	3024	332
Ürettiği enzimler	---	---
Ürettiği Toksinler	Aflatoksin B1, B2, G1	Aflatoksin B1, B2, G1

3.2. Yöntem

Bu çalışmada %96 Nisbi Rutubet ortamında fındık kabuğunun ve kalınlığının *A. flavus*'un iç fındığa penetrasyonunda bir engel olup olmadığı araştırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla kalın ve ince kabuklu iki fındık çeşidi kabuklu ve kabuksuz olarak iki durumda *A. flavus* sporları ile inoküle edildikten sonra 25 °C de %96 NR ortamında depolanmışlar ve zaman içinde iç fındıkta *A. flavus* gelişimi (kolonizasyonu) izlenmiştir. Bulunan sonuçlar aynı şartlarda şahit olarak yapılan *A. flavus* ile inoküle edilmemiş fındıklara ait gelişim oranları ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmayı yapmak amacıyla kullanılan tüm metotlar aşağıda verilmiştir.

3.2.1. Fındıklardan sağlam kabuklu olanların ayrılması

Çalışmada kullanılacak fındıklara stereo mikroskop altında tek tek bakılarak kabuklarının sağlam olup olmadığı incelenmiştir. Sağlam kabuklu fındıklar ayrılıp denemede kabuklu olarak kullanılmış, diğerleri iç fındık şeklinde kullanılmıştır.

3.2.2. Fındık çeşitlerinde ortalama tane ağırlığının belirlenmesi

Çalışmada kullanılan iki fındık çeşitlerinin kabuklu ve iç olarak ortalama ağırlıkları aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Bu amaçla her iki çeşitten rasgele seçilen 100'er adet kabuklu fındık ve rasgele seçilen 100'er adet iç fındık tek tek tartılarak ağırlık dağılımı çıkarılmıştır.

İkinci olarak her iki çeşitten kabuklu fındıklardan 500'er adedi iç fındıklardan 250'şer adedi tartılarak tartım sonucu tane adedine bölünmüş ve ortalama tane ağırlıkları bulunmuştur.

Ortalama tane ağırlığı (g)= toplam tartım(g)/tane adedi

3.2.3. Toprak örneklerinde *A. flavus* aranması

Toprak örneklerinden 10'ar g aseptik şartlarda tartılarak içinde 90 ml steril FTS bulunan erlenmayerlere ilave edilerek bunlardan seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu seri dilüsyonlardan ikişer PDA plakası üzerine 0.1'er ml yayma plaka halinde ekim yapılmış ve plakalar 5 gün 28 °C'de inkübe edildikten sonra gelişen koloniler içinde *A. flavus* kolonisi olup olmadığı gözle ve sonra mikroskopik inceleme ile belirlenmiştir.

3.2.4. Fındık örneklerinde *A. flavus* aranması

Bu amaçla *A. flavus* izolasyonu amaçlı alınan fındık örneklerinden yaklaşık 10 g civarında olacak sayıda fındık aseptik şartlarda içinde 90 ml steril FTS bulunan erlenmayerlere ilave edilerek yüzeydeki fungus parçaları veya sporlarının dilüsyon sıvısına geçmesi için 10 dakika elle çalkalanmış ve bunlardan seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu seri dilüsyonlardan ikişer PDA plakası üzerine 0.1'er ml yayma plaka halinde ekim yapılmış ve plakalar 5 gün 28 °C'de inkübe edildikten sonra gelişen koloniler içinde *A. flavus* kolonisi olup olmadığı gözle ve sonra mikroskopik inceleme ile belirlenmiştir.

3.2.5. A. flavus kültürünün geliştirilmesi

Yatık vasatta temin edilen saf kültürden önce PDA plakalarına sürme yapılmış ve burada saf olduğu görüldükten sonra tek koloniden yeniden çok sayıda PDA yatık vasatlarına sürme ile kullanım kültürleri hazırlanmıştır. Spor oluşması için 7-10 gün 28 °C'de inkübe edilen tüpler kullanılabildiği kadar buzdolabında muhafaza edilmişlerdir. Spor üretiminde bu kültürler kullanılmıştır.

3.2.6. A. flavus kültürünün spor üretimi için çoğaltılması

Bu amaçla daha önce sporlanmaya bırakılan *A. flavus* ekili petrilerin üzerine 5'er ml steril FTS+Tween 20 çözeltisi(%0,02'lik) konulmuş ve bir cam baget ile yatık agar yüzeyi ovularak sporların dilüsyon sıvısına geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan 20 adet PDA plakasına 0.1'er ml yayma olarak ekim yapılmıştır. Plakalar 28 °C'de 10 gün süre ile inkübe edilerek sporulasyonun yeteri kadar olması sağlanmıştır.

3.2.7. İnokülasyonda kullanılacak spor süspansiyonunun hazırlanması

A. flavus'un geliştirildiği petrilerde PDA plakası yüzeyindeki sporlar üzerine aseptik şartlar altında aynı dilüsyon sıvısından 5'er ml eklenmiştir. Bir cam bagetin yardımı ile sporların dilüsyon sıvısına geçmesi artırılmış ve spor süspansiyonları aseptik şartlar altında pipet ile tek bir erlenmayerde toplanmıştır.

3.2.8. Süspansiyonda spor yoğunluğunun direk mikroskopik sayımla belirlenmesi

Bu amaçla Thoma lamı ile sayım yöntemi kullanılmıştır (Halkman ve Gürgün, 1990).

3.2.9. Süspansiyonda spor yoğunluğunun kültürel sayımla belirlenmesi

Bu amaçla, direkt mikroskopik sayım sonuçları da dikkate alınarak stok süspansiyondan seri dilüsyon hazırlanıp her dilüsyondan ikişer PDA plakasına 0.1'er ml yayma kültür yöntemi ile ekim yapılarak sayım yapılmıştır (Halkman ve Gürgün, 1990).

3.2.10. Fındıkların spor süspansiyonu ile inokülasyonu

Fındıkların çeşidinden ve kabuklu olup olmadığından bağımsız olarak hepsinin 10^6 spor/fındık oranında aşılması planlanmıştır. Bu amaçla süspansiyon plastik bir atomizere konulmuş, atomizerin pompasının her tam sıkıldığında püskürttüğü süspansiyon miktarı hesaplanmış ve buna bağlı olarak 25 adet fındık için kaç defa sıkılması gerektiği hesaplanıp fındıklar o düzeyde inoküle edilmişlerdir. Kontrol amacı ile bir örnekten belli sayıda alınan fındık yüzeyindeki sporlar Madde 3.2.4'de belirtildiği gibi kültürel sayım ile belirlenmiştir.

3.2.10.1. İnoküle edilecek fındıklar için kullanılacak süspansiyon miktarının hesaplanması

Her 500 adet fındık içeren grup için kullanılacak süspansiyon miktarı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

Gereken spor miktarı=gruptaki fındık adedi* 1 fındık için gereken spor adedi

Gerekli süspansiyon miktarı (ml)= gereken spor miktarı (adet)/süspansiyondaki spor konsantrasyonu (adet/ml)

Atomizerin örnek üzerine sıkma sayısı= gerekli süspansiyon miktarı(ml)/atomizer ile 1 seferde sıkılan süspansiyon miktarı (ml)

3.2.10.2. Fındıkların spor süspansiyonu ile inokülasyonu

İnoküle edilerek depolanacak her 25 adetlik fındık porsiyonunu oluşturacak 500 adet fındık çok büyük bir polietilen torba içinde düz bir zemine yayılmıştır. Laboratuar ortamının sporlar ile kontamine olmaması için atomizer de aynı polietilen torba içinde tutularak fındıklar üzerine yeterli bir mesafeden hesaplanan miktarda sıkılarak tüm fındıklar

aşlanmıştır. Homojenizasyonun sağlanması için polietilen torba içinde eldiven giyilmiş el ile ve yine büyük torba içinde kalmak kaydı ile fındıklar karıştırılmıştır. Daha sonra bu fındıklar 25'er adet halinde aşlanmış depolama örneklerinin oluşturulmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Fındıkların toksijenik *A.flavus* suşu içeren spor süspansiyonu ile inokülasyonu

3.2.11. % 96 Su aktivitesi solüsyonunun hazırlanması

Kavanozlarda belli nispi rutubetli ortam hazırlamak için eşdeğer su aktivitesine sahip çözeltilerden yararlanılmıştır. Kavanozun kapalı olması ortamında içindeki belli su aktivitesindeki solüsyon ile üst hava boşluğunun denge NR'i arasındaki ilişki;

$$NR = 100 * a_w$$

gösterilir.

Bu nedenle denemede %96 NR ortam için 0.96 a_w değerine sahip NaCl çözeltisinden yararlanılmıştır.

Bu a_w değerini sağlayacak NaCl konsantrasyonunun hesaplanmasında Oregon State Üniversitesi'nin web sayfasında verilen ve sınırlı bir kısmı aşağıda gösterilen tablodan yararlanıldı (Anonim, 2006).

Çizelge 3.2. Belli konsantrasyondaki NaCl çözeltilerinin su aktiviteleeri

NaCl (M)	a_w
0,8	0,974
0,9	0,970
1,0	0,967
1,2	0,960
1,4	0,953
1,6	0,946

Çizelgede de görüldüğü gibi, 0.96 a_w değerindeki çözelti için 1.2 M'lık NaCl çözeltisi hazırlandı. Çözeltinin hazırlanması aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

$$MA_{NaCl} = 58,4$$

$$1,2 \text{ M NaCl} = 1,2 \times 58,4 = 70,08 \text{ gr NaCl/lt}$$

Depolama sürecinde çözeltilerin nem kaybı veya çok az ihtimalde olsa nem kazancı nedeniyle yoğunluklarının ve dolayısıyla a_w değerlerinin değişmesini kontrol etmek amacı ile Çözeltinin $\pm\%25$ aralığının güven sınırları kavanoz üzerine çizildi. Bu hatlar mutlak müdahale hatları olarak kabul edildi. Bu hatlara kadar çıkmış veya inmiş olan solüsyonun a_w değeri kısa aralıklarda konsantrasyon- a_w ilişkisi doğrusal kabul edilerek orantı ile hesaplandı.

Su miktarında $\%25$ 'ten daha fazla kuruma olursa çözeltinin alabileceği en düşük su aktivitesi;

$$1,2/0,75 = 1,6 \text{ M} = 0,946 \text{ } a_w$$

Su eklemelerde $\%25$ 'ten fazla hata yapılmazsa çözeltinin alabileceği en yüksek su aktivitesi;

$$1,2/1,125 = 1,06 \text{ M} = 0,964 \text{ } a_w$$

Buna göre solüsyon düzeyi kavanoz üzerindeki güven aralığı içinde kaldığı sürece a_w değerinin 0.946-0.964 arasında kalacağı hesaplandı.

Çalışma sonunda belli sayıda kavanozda kalan sıvıların a_w değerleri TOKB Ankara İKLM'de Çiğlenme noktası higrometresi ile ölçüldü.

3.2.12. Fındıkların $\% 96$ nisbi rutubette depolanması

Kara fındıklar için 720 cc, tombul fındıklar için 370 cc büyüklüğünde kavanozlar seçildi. Kavanozların içine 20x20 ebadında tel sepetler hazırlandı. Kavanozların kapakları matkapla 3 mm çapında delinerek bu deliklere pamuk kapatıldı. Kavanozlar kapatılıp etüvde sterilize edildi. 720 cc'lik kavanozlara 70 ml, 370 cc'lik kavanozlara 50 ml NaCl çözeltisi

konup, çözelti seviyesinin %25 alt ve %25 üst seviyeleri işaretlendi. Kavanozlara numaralar verildi. Kabuklu fındıklar 18'er adet, iç fındıklar 10'ar adet kavanoza, her çeşitten 25'er adet tartılarak konuldu. Aynı işlem hem aşılınmış hemde aşılınmamış fındıklarda yapıldı.



Şekil 3.2. Kabuklu fındıkların %96 nisbi rutubette depolanması

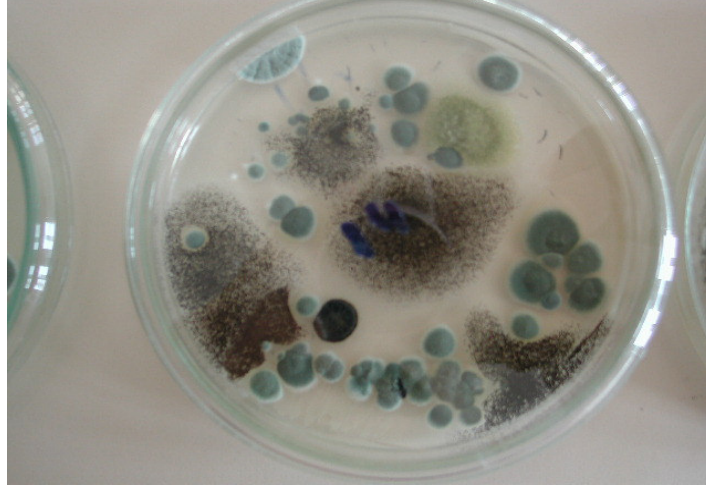


Şekil 3.3. İç fındıkların %96 nisbi rutubette depolanması

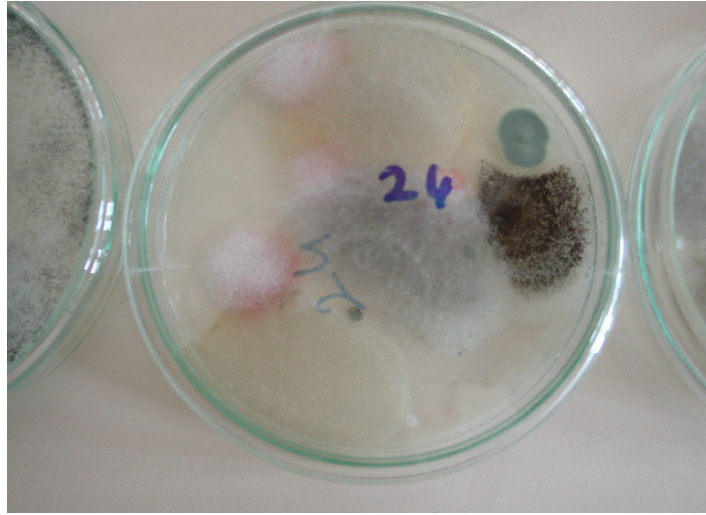
3.2.13. Başlangıç anı fındık örneklerinde yüzey florasının tayini

Bu işlem aşılınmamış fındıklarda yüzey florasında hem fungal yükün hem de tarafımızdan eklenmiş olmasa da *A. flavus* bulunup bulunmadığını ortaya koymak için yapıldı. Aşılınan fındıklarda ise bu inoküle edilen spor miktarının doğrulanması anlamına

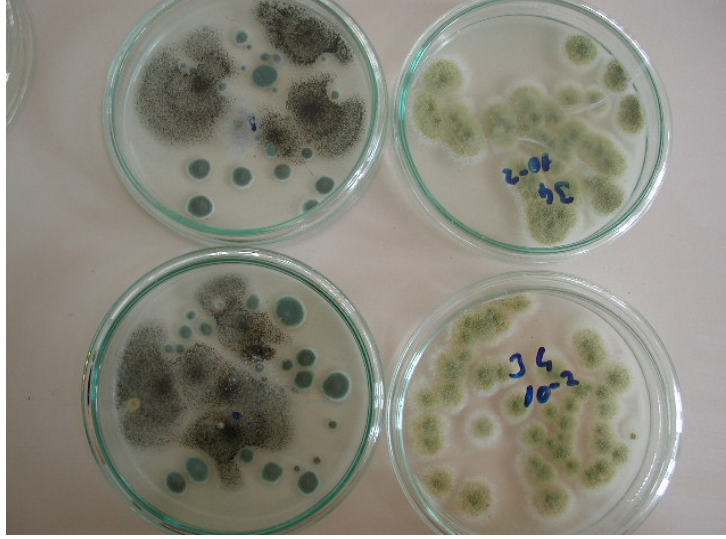
gelmektedir. Aşıl原因 ve aşıl原因mayan ve kavanoza yerleştirilen tüm gruplarda başlangıç anı kontrolü olarak 2'şer adet kavanoz içindeki fındıklar enfeksiyonun tespiti amacı ile yüzey sterilizasyonu yapılmadan önce yüzeylerindeki fungal yükün tespiti amacıyla Madde 3.2.4' de belirtildiği gibi kültürel sayım ile yüzey florası incelemesi yapılmıştır.



şekil 3.4. Aşıl原因mamıř kabuklu kara fındıkta yüzey florası ekim sonuçları



şekil 3.5. Aşıl原因mamıř tumbul iç fındıkta yüzey florası ekim sonuçları



Şekil 3.6. Aşılانmış kabuklu kara fıındıkta yüzey florası ekim sonuçları

3.2.14. Depolanan fıındıklarda funguslarla enfekte tane oranının belirlenmesi

Bu amaçla aşağıda belirtilen işlemler gerçekleştirildi.

3.2.14.1. Yüzey sterilizasyonu için sodyum hipoklorit çözeltisinin hazırlanması

Bu amaçla %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisi kullanıldı. Bu da ticari çözeltinin (çamaşır suyu) sulandırılması ile elde edildi. Üretici firmadan aktif madde oranının %5 olduğu öğrenildi. Buna göre 600 ml saf suya 400 ml çamaşır suyu konarak %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisi hazırlandı.

3.2.14.2. İç fıındıklarda yüzey sterilizasyonu

Yüzeyi sterilize edilecek iç fıındıklar 250 ml'lik steril bir erlenmayere konuldu. Üzerine fıındık tanelerinin üst yüzeyini aşacak miktarda %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ilave edildi. Erlenmayerin ağzındaki pamuk yerine steril alüminyum folyo geçirildi. Bu hali ile erlenmayer fıındıkların yüzeyinin sodyum hipoklorit çözeltisi ile tamamen ıslanabilmesi için 2 dakika şiddetle çalkalandı. Daha sonra sodyum hipoklorit çözeltisi aseptik şartlar

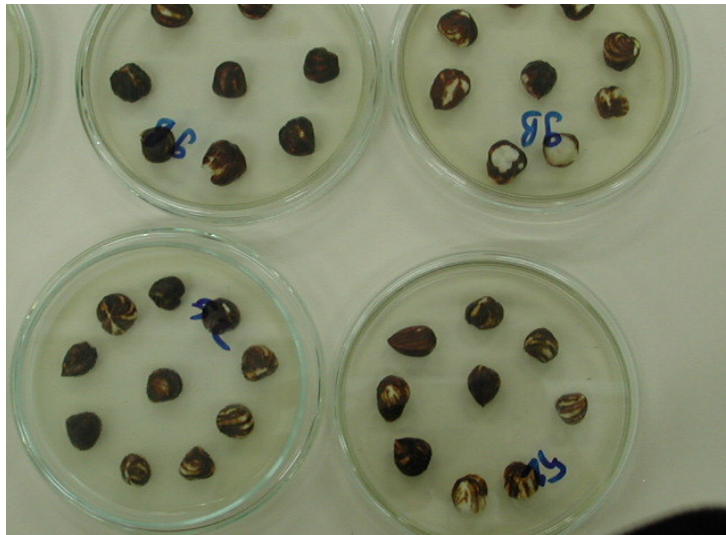
altında boşaltılarak erlene yine aseptik şartlar altında aynı miktarda steril saf su konuldu. Erlen yine aynı şekilde çalkalanarak sodyum hipoklorit çözeltisi uzaklaştırılmaya çalışıldı. Bu yıkama işlemi yaklaşık 7 defa tekrarlandıktan sonra yüzeyi sterilize edilmiş fındıklar steril bir petri kutusu içine aktarıldı.

3.2.14.3. Kabuklu fındıklarda yüzey sterilizasyonu

Kabuk yüzeyinde gelişen küflerin iç tanenin yüzey sterilizasyonunu olumsuz etkilememesi için önce fındıklar kabuklu olarak sodyum hipoklorit çözeltisi ile muamele edildi. Sonra kullanılmamış bir polietilen torba içinde kabukları kırıldı ve iç fındıklar kabuklarından ayrıldı. İçler aseptik şartlar altında yüzey sterilizasyonu yapılacak olan erlenmeye aktarıldılar. Bundan sonra işlem Madde 3.2.14.2’de belirtildiği gibi devam etti.

3.2.14.4. Fındık örneklerinin tane halinde ekimleri

Madde 3.2.14.2’deki gibi sterilize edilip petri kutusuna alınan fındık taneleri 4 ve 5’er adet olacak şekilde steril PDA besiyerlerine ekildi. Ekim yapılan petri kutuları 28 °C’de 5 gün inkübatöre bırakıldı.



Şekil 3.7. Fındık örneklerinin tane halinde ekimleri

3.2.14.5. Enfekte tane oranının belirlenmesi

İnkübatöre bırakılan petrilere 3. ve 5. günlerde mikroskopik sayımlar yapıldı. Enfekte tane oranı şu şekilde belirlendi:

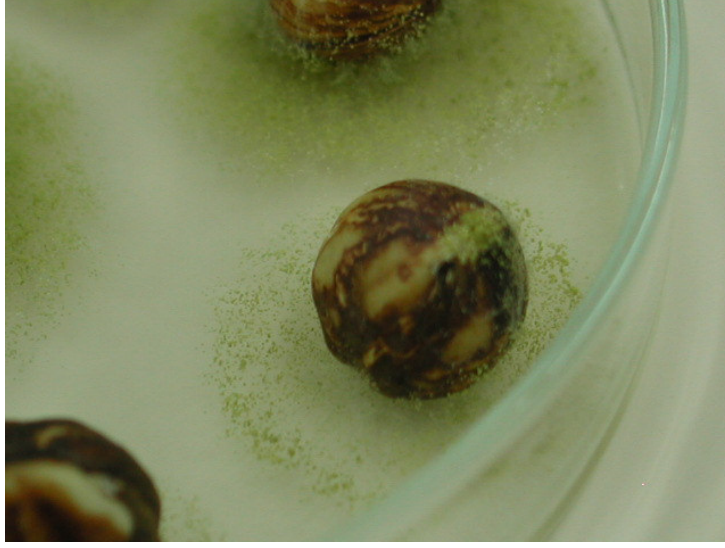
Enfekte tane oranı(%)=100*enfekte olan tane sayısı/toplam ekilen tane sayısı

3.2.15. A. flavus grubu fungusların teşhisi

Bu amaçla PDA üzerinde gelişen tüm küf kolonilerinin *A.flavus* grubu fungus olup olmadığının belirlenmesi için inceleme yapılmıştır. Bu amaçla gerektiğinde şüpheli kolonilerden preparat hazırlanıp bu preparatlar mikroskopta incelenmiştir.

A.flavus grubu fungusların teşhisinde Raper ve Fennel (1977), Samson ve ark. 'dan, (1984) yararlanılmıştır. Bunlara göre *Aspergillus flavus* grubu fungusların belirgin morfolojik özellikleri şunlardır;

- Koloni renkleri üredikleri besiyerine göre mavi-yeşildir. Koloni çapı ise 3.0-5.0 cm arasındadır.
- Konidial başlar yuvarlak, küresel olup çok açık sarı-yeşil daha sonra koyu sarı-yeşil renge dönüşmektedir. Konidial yapısı kültür yaşı ilerledikçe gevşek şekilde sütunsal bir yapıya dönüşebilmektedir.
- Konidioforlar renksiz çoğunlukla pürüzlü ve keçemsi görünümündedirler.
- Vesicle yuvarlaktan yarı yuvarlağa kadar değişen, büyük kafalarda sopamsı veya erlen şeklindedir. Büyük kısmı spor oluşturmaya uygundur.
- Sterigma (spor doğuran hücre) iki veya tek sıralı; her ikisi birden aynı türde veya aynı kafada bulunabilmektedir.
- Selerotia koyu kırmızı-kahverengiden pembe kahverengiye veya siyaha kadar değişmektedir. Yuvarlak, yarı yuvarlak veya uzanmış bir şekilde değişmektedir.



Şekil 3.8. Aşılannış tombul iç fındıkta *A.flavus* gelişimi



Şekil 3.9. *A.flavus* gelişiminin konidial görünümü



Şekil 3.10. A.flavus gelişiminin mikroskofta incelenmesi

4. BULGULAR

4.1. Yöreden a. Flavus İzolasyonu Amaçlı Alınan Toprak Örneklerinde Kültürel Sayım Sonuçları

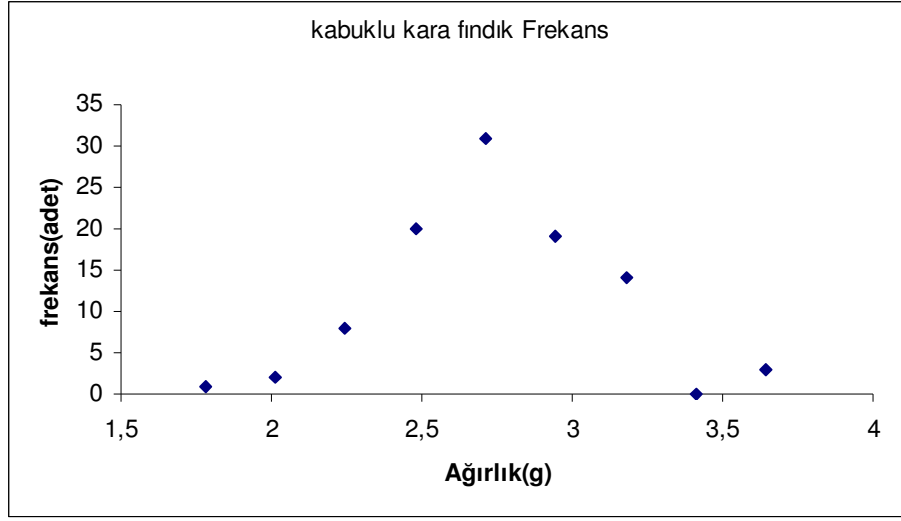
Yöreden *A.flavus* izolasyonu amacıyla alınan 15 adet toprak örneklerinin her birinden 10'ar gr tartılarak steril erlenlerdeki fizyolojik tuzlu sulara konu ve 10^{-3} 'e kadar dilüsyon hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlardan yayma plaka yöntemi ile PDA besiyerlerine çift paralelli ekim yapıldı ve ekilen petriker 28 °C'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda petrikerin hiçbirinde *A.flavus* üremesi gözlenmedi.

4.2. Yöreden A. flavus İzolasyonu Amaçlı Alınan Fındık Örneklerinde Kültürel Sayım Sonuçları

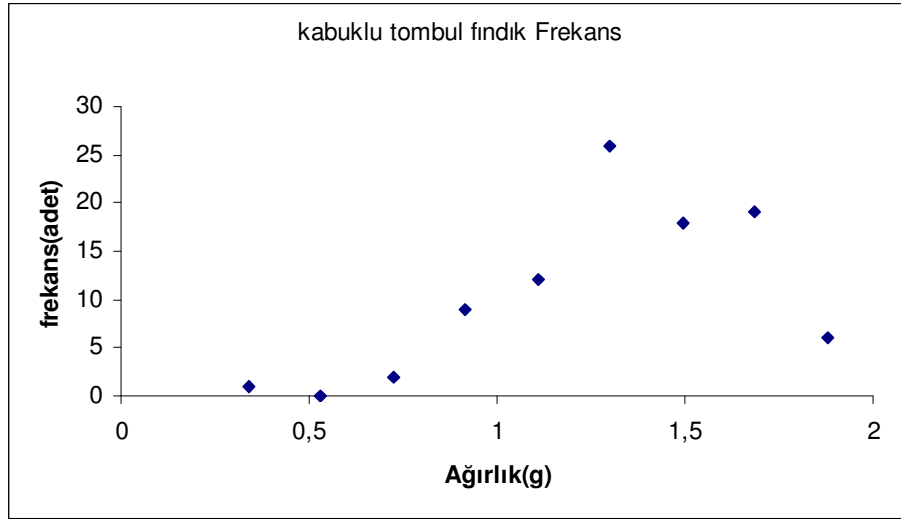
Yöreden *A.flavus* izolasyonu amacıyla alınan 12 adet fındık örneklerinin her birinden 10'ar gr tartılarak steril erlenlerdeki fizyolojik tuzlu sulara konu ve 10^{-3} 'e kadar dilüsyon hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlardan yayma plaka yöntemi ile PDA besiyerlerine çift paralelli ekim yapıldı ve ekilen petriker 28 °C'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda petrikerin hiçbirinde *A.flavus* üremesi gözlenmedi.

4.3. Kara Fındık ve Tombul Fındıkta Tane Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı

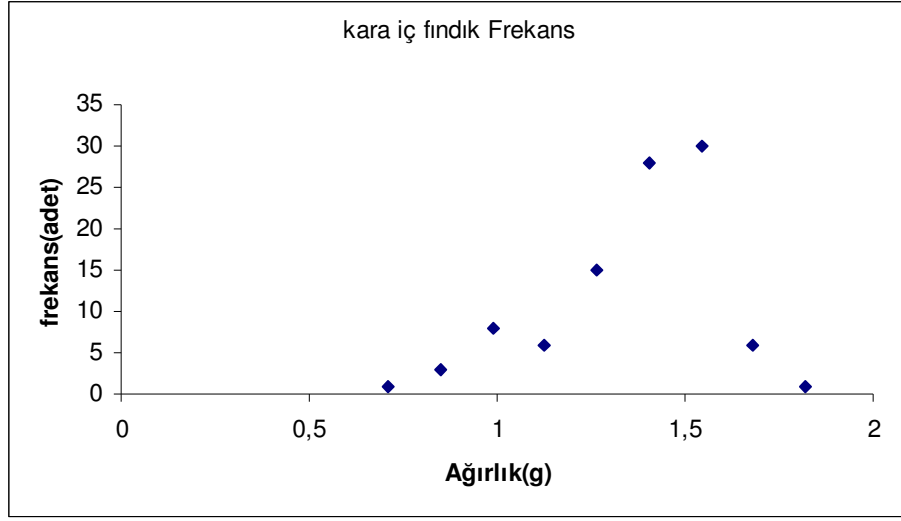
Denemede kullanılacak olan fındıkların iç ve kabuklu olarak tane ağırlıklarının dağılımı aşağıdaki şekillerde gösterilmiş ve bu dağılımlara ait ortalama, standart sapma ve değişim katsayısı değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



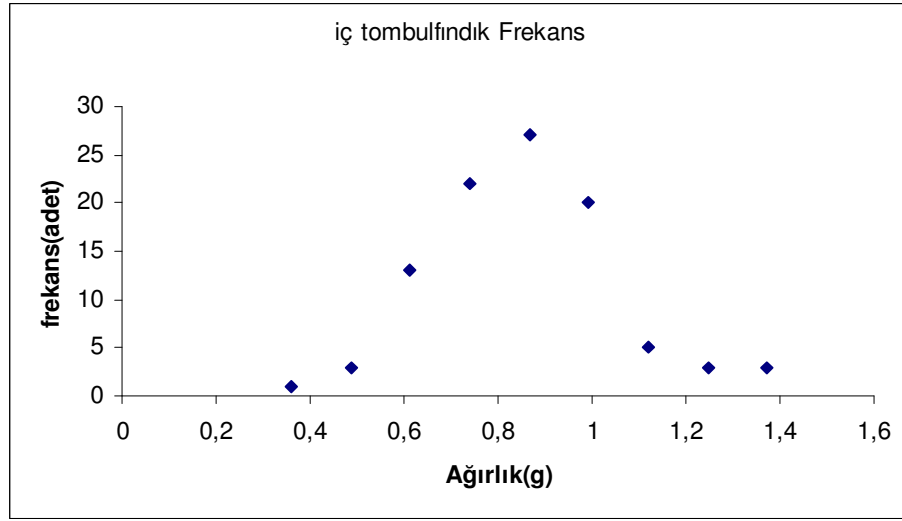
Şekil 4.1. Kabuklu kara fındıkta ağırlık dağılımı



Şekil 4.2. Kabuklu tombul fındıkta ağırlık dağılımı



Şekil 4.3. Kara iç fındıkta ağırlık dağılımı



Şekil 4.4. İç tombul fındıkta ağırlık dağılımı

Çizelge 4.1. Denemede kullanılan kabuklu ve iç fındıklarda ortalama, standart sapma ve değişim katsayıları

	kabuklu kara f.	kabuklu tombu f.	kara fındık iç	tombul fındık iç
N	99	99	99	99
Ortalama	2,63	1,31	1,31	0,80
Standart sapma	0,35	0,33	0,23	0,21
Değişim katsayısı (%)	13,27	25,20	17,49	26,21

Not: Histogram çiziminde programın dışta bıraktığı çok az sayıda veri bu hesaplamanın içine alınmıştır.

4.4. Depolama Denemesi Boyunca Fındıklarda Enfekte Tane Oranında Değişim

4.4.1. İç fındıklarda *A.flavus* gelişimi oranları

İç fındıklarda kabuk olmadığından *A. flavus*'un taneleri kolayca enfekte edebileceğini göstermek amacı ile sadece *A. flavus* enfeksiyonu izlenmiştir. Fındıklar 2 hafta %96 NR rutubet sağlayan çözelti üzerinde bekletilmişlerdir. Yüzey sterilizasyonunun etkinliğini göstermek için inokülasyonun hemen arkasından yapılan yüzey sterilizasyonundan sonra ekilen her iki örnekten 25'er adet tane, PDA'da 7 gün inkübasyon sonunda tombul fındıkta hiç *A. flavus* kolonisi oluşmamış, kara fındıkta ise 6 adet tanede *A. flavus* kolonisi gözlenmiştir. Bu kontrol 3×10^6 adet spor/fındık düzeyinde yüzeye ilave edilen *A.flavus* sporlarının yüzey sterilizasyonu ile uzaklaştırıldığı anlamına gelmektedir.

A.flavus sporları ile inoküle edilmiş ve edilmemiş fındıkların %96 NR sağlayan çözelti üzerinde 2 hafta depolaması sonucu *A.flavus* ile enfekte olan tanelerin oranları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2'de görüleceği üzere *A. flavus* ile inoküle edilen fındıklarda çeşitten bağımsız olarak enfeksiyon oranı %84-100 civarına yükselirken inoküle edilmeyenlerde her iki çeşitte 25'er tanede sadece birer adedinde *A. flavus* kolonisi görülmüştür. Buna dayanarak inoküle edilen fındıklarda enfeksiyonun kaynağının aşılana *A.flavus* sporları olduğu söylenebilir. Ayrıca tabloya bakılarak yeteri kadar nem olduğunda ve yeteri kadar spor bulunduğu tüm fındık tanelerinin 1-2 hafta içinde *A. flavus* ile enfekte olabileceği gösterilmiştir.

Çizelge 4.3’de bu bulgulara ailt varyans analizi verilmiştir. Buna göre *A.flavus* enfeksiyonunda çeşitlerin ve çeşit inokülasyon interaksyonunun etkisi olmadığı halde sadece inokülasyonun etkili olduğu ($p=0.000$) gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *A.flavus* sporları ile inoküle edilmiş ve edilmemiş fındıkların %96 NR sağlayan çözelti üzerinde 2 hafta depolaması sonucu *A.flavus* ile enfekte olan tanelerin oranları

İç fındıkların depolama süresi içinde tanelerde <i>A. flavus</i> enfeksiyonunda değişim									
<i>A. flavus</i> enfeksiyonu görülen taneler									
Depolama süresi (gün)	Ekilen tane	Kara fındık				Tombul fındık			
		İnokülasyon yok		İnokülasyon var		İnokülasyon yok		İnokülasyon var	
		Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
7	25	0	0	24	96	0	0	21	84
7	25	0	0	25	100	0	0	25	100
13	25	1	4	25	100	1	4	25	100
13	25	0	0	24	96	0	0	25	100

Not: *A.flavus* ile inoküle edilen fındıkların inokülasyondan hemen sonra yapılan yüzey sterilizasyonunun etkenliği kontrollerinde; inkübe edilen 25'er fındıktan kara ve tombul fındıkta sırasıyla 6 ve 0 tane *A. flavus* ile enfekte tane görülmüştür.

Çizelge 4.3. İç fındıklarda depolama sırasında *A. flavus* ile enfekte tane artışı

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	sd	Kareler ortalaması	F	p
Model	36872,000(a)	3	12290,667	635,724	,000
sabit	38416,000	1	38416,000	1987,034	,000
Çeşit	4,000	1	4,000	,207	,657
inokülasyon	36864,000	1	36864,000	1906,759	,000
çeşitXinokülasyon	4,000	1	4,000	,207	,657
Hata	232,000	12	19,333		
Toplam	75520,000	16			
Düzeltilmiş toplam	37104,000	15			

4.4.2. Kabuklu fındıklarda depolama boyunca toplam fungal kolonizasyon ve *A. flavus* kolonizasyonunun değişimi

4.4.2.1. Kabuklu fındıklarda *A.flavus* kolonizasyonunun depolama süresince değişimi

Kabuklu fındıklarda depolama boyunca gelişen (iç tanede) *A.flavus* kolonizasyonunun değişimi Çizelge 4.4’de görülmektedir.

Çizelge 4.4. Kabuklu fındıklarda depolama süresi içinde görülen *A. flavus* enfeksiyonundaki değişim (PDA'da gözlenen)

Depolama süresi(gün)	<i>A. flavus</i> enfeksiyonu görülen taneler											
	Kara fındık						tombul fındık					
	inokülasyon yok			inokülasyon var			inokülasyon yok			inokülasyon var		
	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%
7	25	0	0	25	0	0	25	0	0	25	0	0
7	25	0	0	25	0	0	25	0	0	21	1	4,76
13	25	0	0	20	0	0	25	0	0	25	0	0
13	25	0	0				25	0	0	25	1	4
20				25	5	20				25	0	0
20				25	1	4				25	2	8
27	25	0	0	25	2	8	25	1	4	25	0	0
27	25	0	0	25	1	4	25	1	4	25	8	32
41	13	0	0	12	2	16,67	12	0	0	12	12	100
41	13	0	0	13	0	0	12	0	0	12	0	0
66	12	0	0	10	0	0	12	0	0	12	0	0
66	12	0	0	11	11	100	13	0	0	12	0	0
95	12	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0
95	11	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0
125	12	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0
125	12	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi inokülasyonun yapılmadığı kontrol ekimlerinde sadece tombul fındıkta 27. gün ekimlerinde 1'er tanede *A.flavus* kolonizasyonuna rastlanmıştır. *A.flavus* ile inoküle edilen kabuklu kara fındıklarda 15 örneğin 5 adedinde 1-11 adet fındıkta (%4-100 arasında) *A.flavus* kolonizasyonu olmuştur. Tombul fındıklarda ise 16 örneğin 4 adedinde 1-12 tanede (%4-100) *A. flavus* kolonizasyonu gözlenmiştir.

Depolamanın 27. gününden itibaren fındıkların görünür biçimde küflenmesi, yüzey sterilizasyonu yapılsa bile çok sayıda fungusun aktif olarak tüm tanelerin üzerini kaplaması ve dolayısı ile tane üzerinde *A.flavus* kolonizasyonunun gözden kaçırılma ihtimaline karşılık her kavanozdan alınan 25 tanenin yarısı %7.5 NaCl içeren PDA plaklarına ekilmişlerdir. Bu durumda çok hızlı gelişim gösteren tarla funguslarının taneyi enfekte etmiş olsalar bile bu ortamda gelişemeyecekleri için var olabilecek *A.flavus* gelişimini baskılayamayacaklar ve dolayısıyla eğer *A.flavus* enfeksiyonu varsa örtülmeden veya baskılanmadan görülebilecektir.

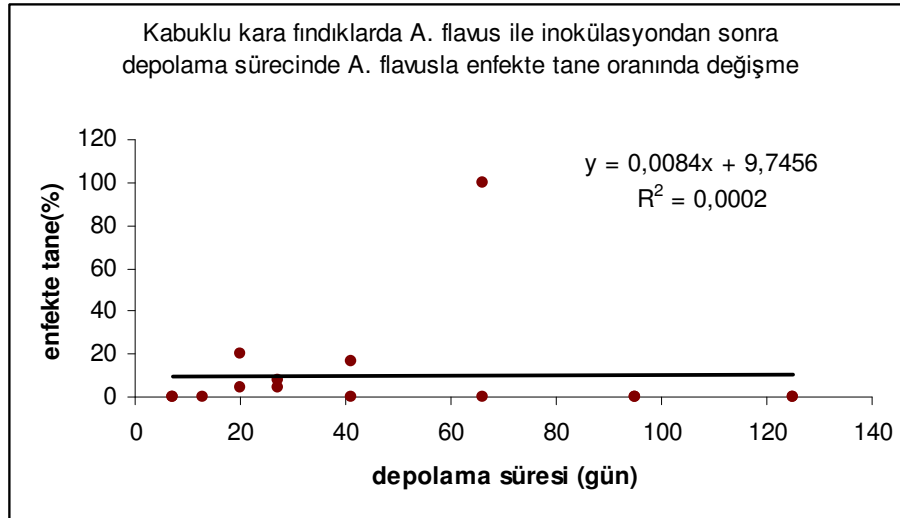
Kabuklu fındıklarda *A.flavus* enfeksiyonuna(kolonizasyonuna) ait verilerin varyans analizi Çizelge 4.5'de görülmektedir.

Çizelge 4.5. Kabuklu fındıklarda toplam *A.flavus* enfeksiyonu üzerine inokülasyon, depolama süresi ve çeşidin etkisine ait varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Kareler	S.D	Kareler ortalaması	F	Önemlilik (p)
İnokülasyon	1684,464	1	1684,464	4,731	,037
Çeşit	1,799	1	1,799	,005	,944
Depolama Süresi	2088,624	8	261,078	,733	,662
İnokülasyonxÇeşit	,254	1	,254	,001	,979
İnokülasyonxDep.süresi	1992,718	7	284,674	,799	,593
ÇeşitxDepolama süresi	2289,915	8	286,239	,804	,604
İnokxÇeşitxDep.süresi	2140,316	7	305,759	,859	,548
Hata	11750,227	33	356,067		
Toplam	24300,454	67			
Düzeltilmiş toplam	22036,952	66			

Çizelgede 4.5'de görüldüğü gibi sadece inokülasyonun etkisi sınırdan önemli bulunmuştur ($p=0.037$). Diğer faktörler, özellikle depolama süresi ve inokülasyonXdepolama süresi interaksyonu istatistikî olarak önemli bulunmamıştır.

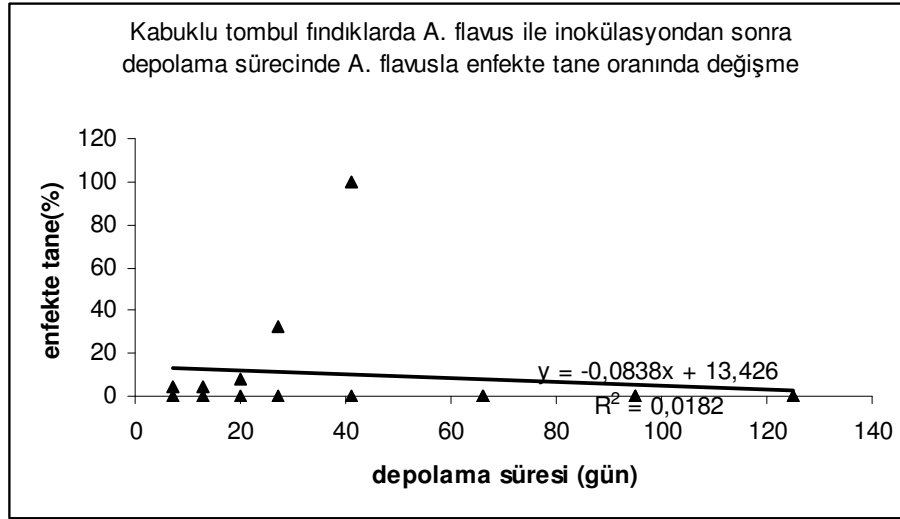
Şekil 4.5 ve 4.6'da inoküle edilen fındıklarda depolama süresine bağlı olarak *A.flavus* ile enfekte olan tane yüzdesinin değişimi görülmektedir.



Şekil 4.5. Kabuklu kara fındıklarda *A.flavus* ile inokülasyondan sonra depolama sürecinde *A.flavus*'la enfekte tane oranında değişme

Şekilde görüldüğü gibi depolama süresince *A.flavus* enfeksiyonuna ait artış trendine ait doğrunun eğimi hemen hemen sıfırdır ve doğrunun istatistiksel olarak önemliliğine ait R2 değeri hemen hemen sıfıra eşittir.

Şekil 4.6'da *A.flavus* ile inoküle edilen kabuklu tombul fındıklarda *A.flavus* enfeksiyonunun(kolonizasyonunun) zamana bağlı değişimi görülmektedir.



Şekil 4.6. Kabuklu tombul fındıklarda *A.flavus* ile inokülasyondan sonra depolama sürecinde *A.flavus*'la enfekte tane oranında değişme

Depolamanın 41. gününden itibaren alınan örneklerde tanelerin yarısı %7,5 NaCl içeren PDA vasatlarında ekilerek *A.flavus* enfeksiyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece tarla funguslarının gelişmesi engellenerek olası bir depo fungusunun gelişmesinin baskılanması sağlanmıştır.

%7.5 NaCl içeren PDA larda yapılan *A.flavus* ile enfekte tane belirlenmesine ait sonuçlar Çizelge 4.6'da görülmektedir.

Çizelge 4.6. Kabuklu fındıkların depolama süresi içinde tanelerde *A. flavus* enfeksiyonunda değişimi (%7.5 NaCl içeren PDA'da gözlenen)

Depolama süresi(gün)	<i>A. flavus</i> enfeksiyonu görülen taneler											
	Kara fındık						tombul fındık					
	inokülasyon yok			inokülasyon var			inokülasyon yok			inokülasyon var		
	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%
41	12	1	8,33	13	2	15,38	13	0	0	10	10	100
41	12	0	0	12	0	0	13	0	0	13	0	0
66	13	0	0	15	0	0	13	0	0	13	0	0
66	13	0	0	13	6	46,15	10	0	0	13	0	0
95	13	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0
95	13	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0
125	13	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0
125	13	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi inoküle edilmeyen örneklerde sadece kara fındıklarda 1 örnekte ve sadece 1 tanede (%8.33) *A.flavus* kolonizasyonu görülmektedir. İnoküle edilenlerde ise kara fındıkta 2 örnekte ve tombul fındıkta 1 örnekte 2- 10 tanede (%15,38-100 oranında *A. flavus* kolonizasyonuna rastlanmıştır.

A.flavus enfeksiyonunun %7,5 NaCl içeren PDA'lı vasatlarda belirlenen düzeyin üzerine depolama süresi, inokülasyon ve çeşidin etkisine ait varyans analizi çizelge 4.7'de görülmektedir.

Çizelge 4.7. Kabuklu fındıklarda *A.flavus* enfeksiyonunun %7.5 NaCl içeren PDA ile belirlenen düzeyi üzerine *A.flavus* inokülasyonu, depolama süresi ve fındık çeşidinin etkisine ait varyans analizi tablosu.

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	S.D.	Kareler ortalaması	F	Önemlilik (p)
İnokülasyon	733,494	1	733,494	1,887	,188
Çeşit	28,366	1	28,366	,073	,790
Depolama süresi	1277,775	3	425,925	1,096	,379
İnokülasyonxçeşit	68,430	1	68,430	,176	,680
İnok.xdepolama süresi	965,275	3	321,758	,828	,498
Çeşitxdepolama süresi	965,275	3	321,758	,828	,498
İnok.xçeşitx dep.süresi	1277,775	3	425,925	1,096	,379
Hata	6218,154	16	388,635		
Toplam	12436,308	32			
Düzeltilmiş toplam	11534,545	31			

Çizelgede 4.7'de görüldüğü gibi inokülasyon da dâhil olmak üzere hiçbir faktör ve interaksiyonlar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

4.4.2.2. Kabuklu fındıklarda fungal kolonizasyonun depolama süresince değişimi

Çizelge 4.8. Kabuklu fındıkların depolama süresi içinde tanelerde toplam fungal enfeksiyonda değişimi (PDA'da gözlenen)

Depolama süresi(gün)	enfeksiyon görülen taneler											
	Kara fındık						tombul fındık					
	inokülasyon yok			inokülasyon var			inokülasyon yok			inokülasyon var		
	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%
7	25	24	96	25	25	100	25	24	96	25	25	100
7	25	25	100	25	25	100	25	23	92	21	21	100
13	25	20	80	20	20	100	25	21	84	25	20	80
13	25	25	100				25	23	92	25	14	56
20				25	25	100				25	25	100
20				25	25	100				25	23	92
27	25	25	100	25	25	100	25	25	100	25	23	92
27	25	25	100	25	25	100	25	25	100	25	17	68
41	13	13	100	12	12	100	12	12	100	12	12	100
41	13	13	100	13	13	100	12	12	100	12	12	100
66	12	12	100	10	10	100	12	12	100	12	12	100
66	12	12	100	11	11	100	13	11	84,61	12	12	100
95	12	12	100	12	12	100	12	12	100	12	12	100
95	11	11	100	12	12	100	12	12	100	12	12	100
125	12	12	100	12	12	100	12	12	100	12	12	100
125	12	12	100	12	12	100	12	12	100	12	12	100

Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi toplam fungal enfeksiyon kabuklu tanelerde sadece 1 örnek hariç %84 -100 arasında değişmiştir. Depolamanın 7-27 günleri arasında enfeksiyon %56-100 arasında değişirken 41. günden itibaren sadece bir örnek (%84.61) 35 örnekte tüm taneler enfekte olmuştur. Buna dayanarak toplam fungal enfeksiyonun başlangıçta nispeten az daha sonra biraz daha yüksek olduğu söylenebilir. Bu amaçla yapılan varyans analizi Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Kabuklu tanelerde depolama süresince toplam fungal enfeksiyonda değişim

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	S.D.	Kareler ortalaması	F	Önemlilik (p)
İnokülasyon	71,334	1	71,334	,447	,508
Çeşit	2,735	1	2,735	,017	,897
Depolama süresi	7961,021	8	995,128	6,240	,000
İnokülasyonxçeşit	410,579	1	410,579	2,575	,118
İnok.xdeneme süresi	302,676	7	43,239	,271	,961
Çeşitxdeneme süresi	2860,990	8	357,624	2,243	,049
İnok.xçeşitxden. süresi	1516,325	7	216,618	1,358	,255
Hata	5262,343	33	159,465		
Toplam	596871,763	67			
Düzeltilmiş toplam	18575,693	66			

Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi sadece depolama süresi ($p=0.000$) ile çeşitXdepolama süresi interaksyonu ($p=0.049$) fungal değişimde önemli bulunmuştur.

Tablolarda sadece enfekte tane olarak görülmekle birlikte depolamanın sonuna doğru aynı tanede birden fazla fungus kolonisi daha yaygın hale gelmiş ve taneler üzerinde fungal gelişme çok daha güçlü olmuştur. Bu gelişen funguslar çoğunlukla *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinin dışında yani depo fungusları olmuştur. *A.flavus* kolonizasyonunun daha iyi görülebilmesi için 41. günden itibaren her örnekteki fındık tanelerinin yarısı (tabii olarak yüzey sterilizasyonundan sonra) %7.5 NaCl içeren PDA vasatına ekilmiştir. Bu vasatta hemen hemen sadece depo fungusları (*Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait funguslar) gelişebilmektedir. Bu vasatta enfekte tanelerin depolama süresince değişimi Çizelge 4.10’ da görülmektedir.

Çizelge 4.10. Kabuklu fındıkların depolama süresi içinde tanelerde depo fungusu enfeksiyonunda değişimi (%7.5 NaCl içeren PDA’da gözlenen)

Depolama süresi(gün)	A. flavus enfeksiyonu görülen taneler											
	Kara fındık						tombul fındık					
	inokülasyon yok			inokülasyon var			inokülasyon yok			inokülasyon var		
	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%	ekilen tane	adet	%
41	12	12	100	13	8	61,54	13	13	100	10	10	100
41	12	12	100	12	12	100	13	13	100	13	13	100
66	13	13	100	15	15	100	13	13	100	13	13	100
66	13	13	100	13	9	69,23	10	5	50	13	13	100
95	13	13	100	13	13	100	13	13	100	13	13	100
95	13	13	100	13	13	100	13	13	100	13	13	100
125	13	13	100	13	13	100	13	13	100	13	13	100
125	13	13	100	13	13	0	13	13	100	13	13	100

Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi depo fungusu enfeksiyonu yönünden 32 örnekten sadece 3’ünde enfeksiyon %100’ün altındadır. Diğer 29 örnekte tüm örneklerde tüm taneler depo fungusları ile de enfekte durumdadır.

4.4.3. Depolanan kabuklu fındıklarda depolama başlangıcında ve sonunda yüzeyde toplam fungus ve A.flavus düzeyleri

Kabuk yüzeyinde önceden varolan sporların yanında yüzeyde gelişen fungal yükün bilinmesi ve aşılana ve aşılınmayan fındıkların yüzeyinde başlangıçta ve deneme sonunda

varolan *A.flavus* yükünün belirlenmesi amacıyla kabuklu fındıkların yüzeyindeki fungal yük belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla *A.flavus* inoküle edilmeyen fındıklarda başlangıç anında 25 adet fındık 100 ml dilüsyon çözeltisi içinde çalkalanarak bunlardan seri dilüsyonlar hazırlandı, bunlardan PDA'ya yayma plaka halinde yapılan plaklarda toplam küf sayımı ve *A. flavus* grubu fungusların sayımı yapılmıştır.

A.flavus ile inoküle edilmemiş örneklerde toplam küf sayımı Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Denemede kullanılan fındıklarda yüzey fungal yükü

cesit	ic/k	inokülasyon	Sayım (kob/adet fındık)
kf	k	yok	$1,3 \times 10^4$
kf	k	yok	$3,1 \times 10^4$
tf	k	yok	$1,8 \times 10^4$
tf	k	yok	$2,3 \times 10^4$
tf	ic	yok	$5,2 \times 10^3$
tf	ic	yok	$1,2 \times 10^4$
kf	ic	yok	$1,1 \times 10^4$
kf	ic	yok	$1,2 \times 10^4$

Çizelgede görüldüğü gibi denemede kullanılan fındıkların yüzeyindeki küf yükü $0.5-3.1 \times 10^4$ cfu/adet fındık arasında değişmiştir. İçlerin fungal yükü kabukluların biraz daha altındadır. Aynı plaklarda *A.flavus* kolonisi varlığı da araştırılmıştır. İlk dilüsyundan (-1) 4'er petriye yapılan ekimlerde sadece 4 örneğe ait 7 adet petride 1'er adet *A.flavus* kolonisine rastlanmıştır. Sayının bu kadar düşük olması nedeniyle bir sayım sonucu hesaplanmamıştır ancak bu düzey en fazla 100-200 kob/ adet fındığa tekabül etmektedir.

Aşılama sonrası yüzeyde oluşan *A.flavus* yükü de aynı yöntemle belirlenmiş olup sonuçlar Çizelge 4.12'de da verilmiştir.

Çizelge 4.12. Deneme başlangıcında aşılanan fındıklarda yüzeyde *A.flavus* yükü

cesit	ic/k	inokülasyon	Sayım (kob/adet fındık)
kf	k	var	$1,8 \times 10^5$
kf	k	var	$1,2 \times 10^5$
tf	k	var	$6,1 \times 10^5$
tf	k	var	$5,7 \times 10^5$
kf	ic	var	$1,0 \times 10^5$
kf	ic	var	$1,3 \times 10^5$
tf	ic	var	$1,1 \times 10^5$
tf	ic	var	$1,9 \times 10^5$

Aşılama sonunda fındıklarda fungal yük hemen hemen tamamen *A.flavus*'tan oluşmuştur. Bazı petrilere tek tük farklı kolonilere rastlanmıştır. Çizelgede görüldüğü gibi *A. flavus* yükü $1.0-6.1 \cdot 10^5$ arasında değişmiş ve kabuk ve iç arasında önemli bir farklılık oluşturmamıştır. Bu düzeyde aşılama benzeri çalışmalarda kullanılan bir düzeydir .

Önemli olan depolama sürecinde bu yükün yok olup almadığıdır. Denemenin 126. gününde aynı sayım yapılmış olup sonuçlar Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Depolama sonunda kabuklu fındıkların yüzeyinde toplam küf yükü

cesit	ic/k	inokulasyon	Sayım (kob/adet fındık)
tf	k	var	$2,8 \times 10^6$
tf	k	var	$1,9 \times 10^6$
kf	k	var	$2,6 \times 10^6$
kf	k	var	$7,1 \times 10^6$
kf	k	yok	$9,6 \times 10^6$
kf	k	yok	$9,4 \times 10^6$
tf	k	yok	$3,9 \times 10^6$
tf	k	yok	$2,0 \times 10^6$

Çizelge 4.14. Depolama sonunda kabuklu fındıkların yüzeyinde *A.flavus* yükü

cesit	ic/k	inokulasyon	Sayım (kob/adet fındık)
tf	k	var	$1,5 \times 10^5$
tf	k	var	$2,6 \times 10^5$
kf	k	var	$1,4 \times 10^5$
kf	k	var	$9,2 \times 10^4$
kf	k	yok	(*)
kf	k	yok	(*)
tf	k	yok	(*)
tf	k	yok	(*)

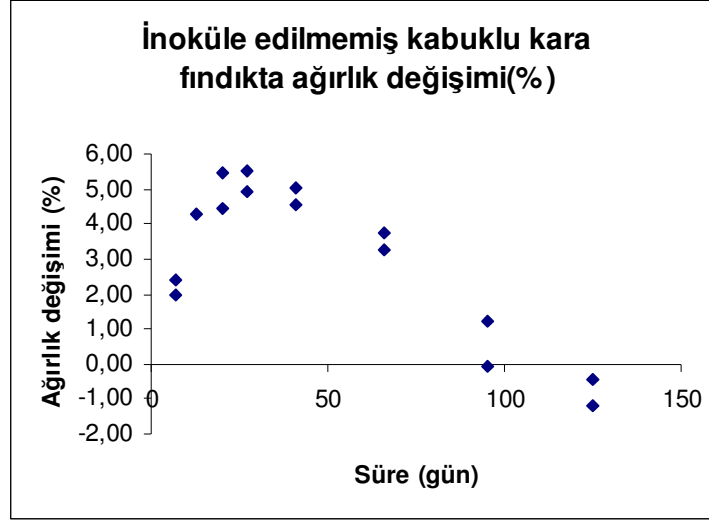
(*) ekilen 3 dilüsyona ait petrilere hiç birisinde *A.flavus* kolonisi görülmemiştir.

4.4.4. Depolama denemesi boyunca fındıklarda ağırlık değişimi

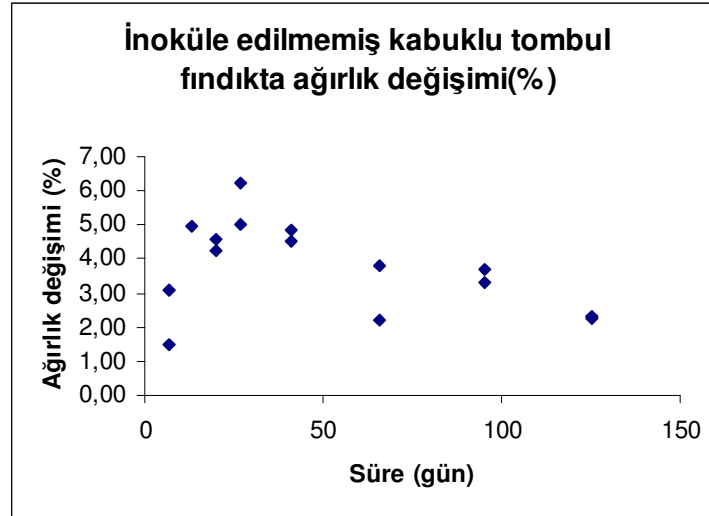
Metot bölümünde belirtildiği gibi, depolamaya konulacak tüm fındıklar önce tartılıp sonra kavanoza yerleştirilmişlerdir. Her kavanoz depodan alındığında yüzey sterilizasyonu yapılmadan önce fındıklar tartılmışlardır. İlk tartım ile son tartım arasındaki farkın % ifadesi bize ağırlık değişimini vermiştir.

İnoküle edilenlerde tartım inokülasyondan sonra yapılmıştır.

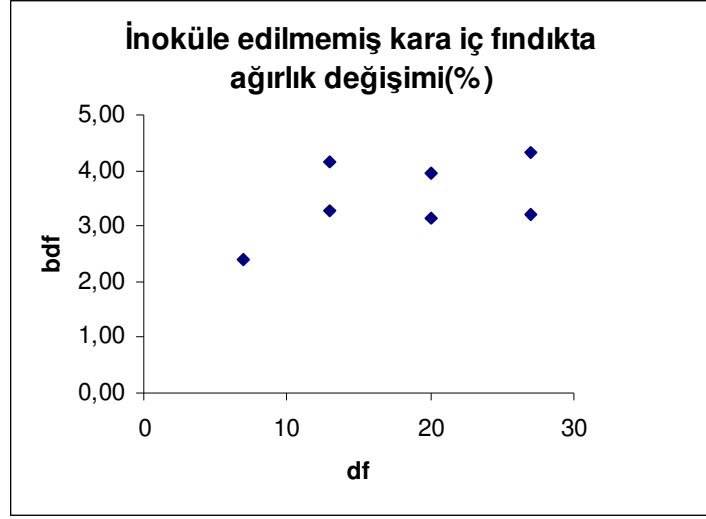
Aşağıda tüm depolamada tutulan fındıkların depodan çıkarıldıkları andaki, depolama başlangıcına göre ağırlık değişimleri grafikler halinde verilmiştir.



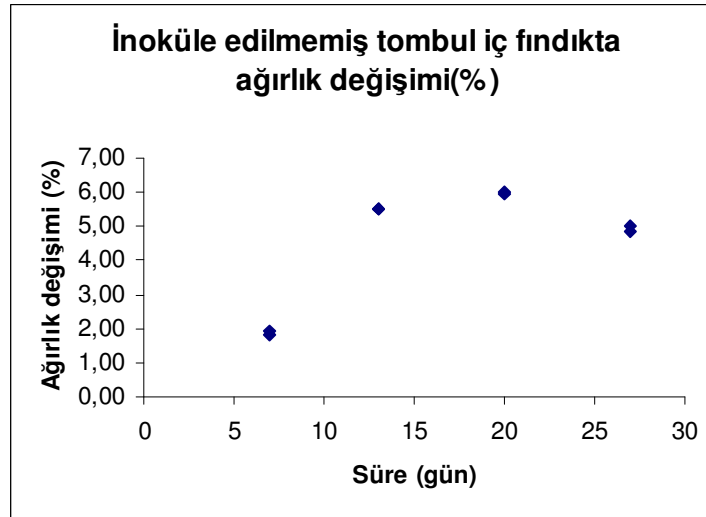
Şekil 4.7. İnoküle edilmemiş kabuklu kara fındıkta ağırlık değişimi(%)



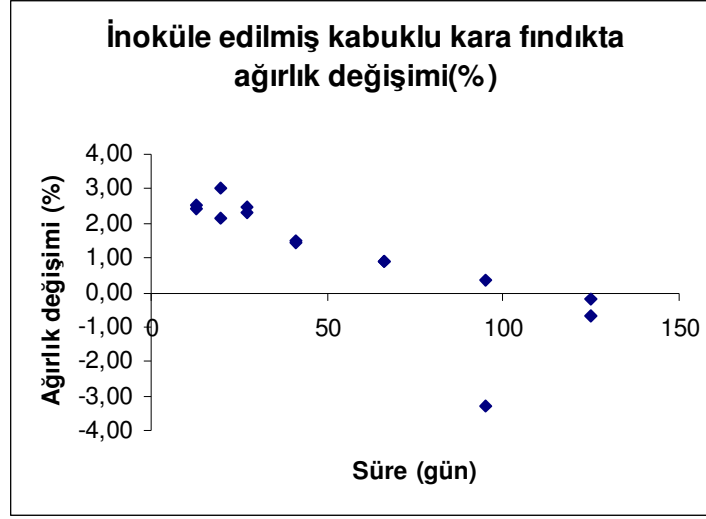
Şekil 4.8. İnoküle edilmemiş kabuklu tombul fındıkta ağırlık değişimi(%)



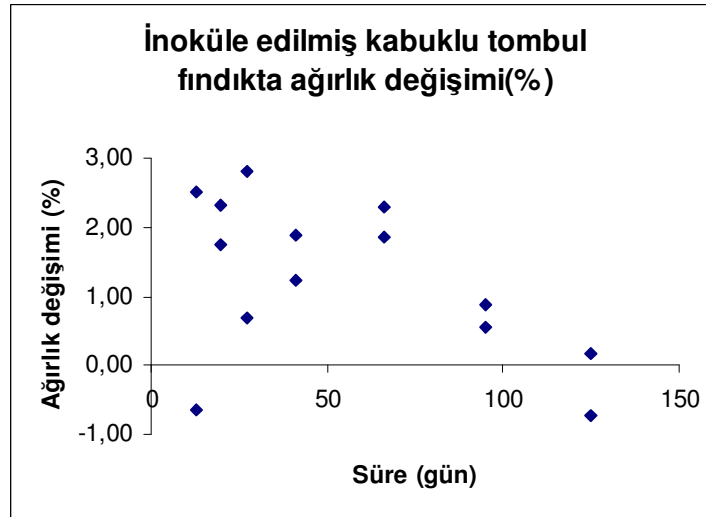
şekil 4.9. İnoküle edilmemiş kara iç fıındıkta ağırlık değişimi(%)



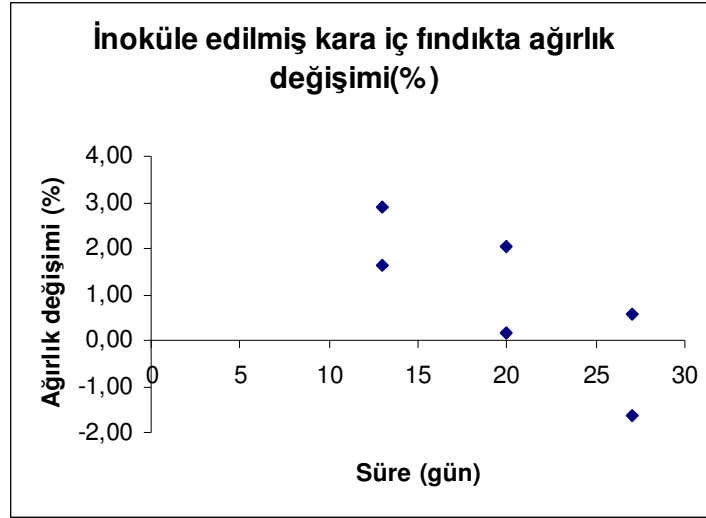
şekil 4.10. İnoküle edilmemiş tombul iç fıındıkta ağırlık değişimi(%)



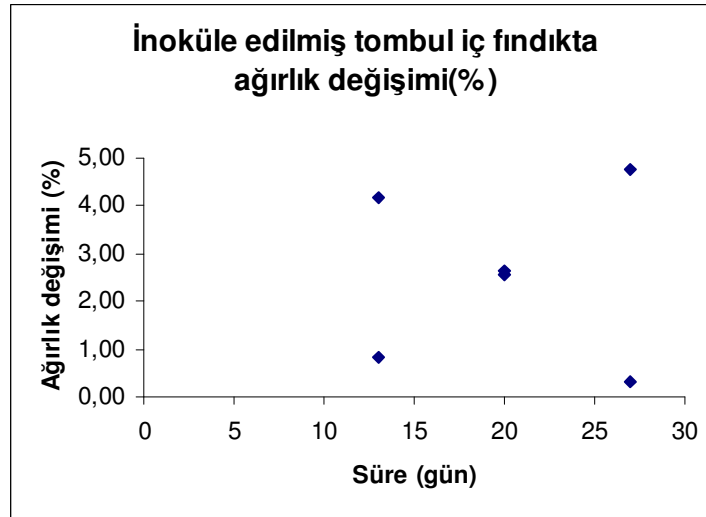
Şekil 4.11. İnoküle edilmiş kabuklu kara fıındıkta ağırlık değışimi(%)



Şekil 4.12. İnoküle edilmiş kabuklu tombul fıındıkta ağırlık değışimi(%)



Şekil 4.13. İnoküle edilmiş kara iç fıındıkta ağırlık değişimi (%)



Şekil 4.14. İnoküle edilmiş tombul iç fıındıkta ağırlık değişimi (%)

Yukarıda grafiklerde her nokta bir kavanozdaki 25 adet fıındığın toplam ağırlığındaki depolama başlangıcı ve depodan çıkarıldığı an arasındaki ağırlık farkını göstermektedir. Her veri ayrı fıındık kavanozundan elde edildiğinden süreç boyunca düzenli bir eğilim gözükmemektedir.

Ancak genelde tüm değişimler pozitif yöndedir. Buna göre genelde depolama süresince fındıkların nem alarak ağırlığının arttığı görülmektedir. İnoküle edilmemiş fındıklarda bu nem değişimi daha düzenli görülmektedir.

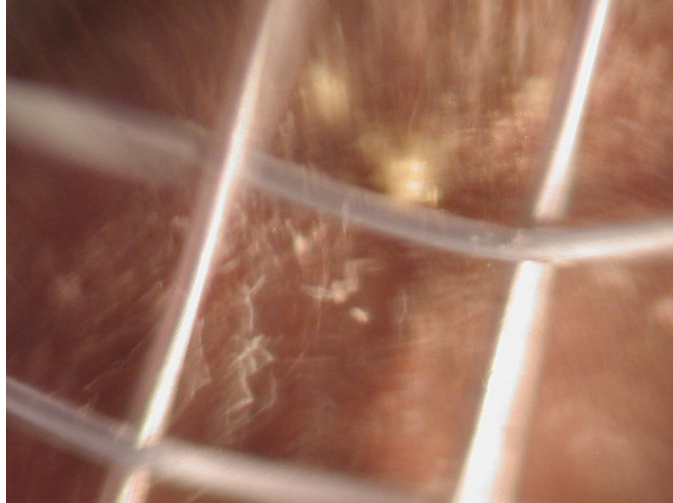
Depolamada nem artışı çok açık gözükme de fındık yüzeyinde nem artmış ve fındıkların yüzeyinde gözle görülebilir bir fungal gelişim meydana gelmiştir.

Aşağıda Şekil 4.15’ de depolamaya yeni konulan bir kavanoz görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi fındıkların yüzeyin herhangi bir küf gelişimi gözlenmemektedir.



Şekil 4.15. Depolamaya yeni konulan bir kavanoz

Şekil 4.16 ’da ise tel file içinde depolama süresinde fındık yüzeyinde gelişen koloniler gözükmemektedir.



Şekil 4.16. Depolama süresince tel file içindeki fındıkların yüzeyinde gelişen koloniler

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yöre topraklarından ve yörede alınan fındık örneklerinden PDA besiyerine yapılan ekimlerde hiçbir *A.flavus* kolonisine rastlanmamıştır.

Asıl depolama denemesi sırasında kullanılan 4 adet kabuklu ve 4 adet iç fındığın yüzey florası 25'er adet fındığın dilüsyon çözeltisi içinde çalkalanmış ve bunlardan yapılan ekimler ile belirlenmiştir. Buna göre fındık yüzeylerinde toplam fungal yük $5,2 \times 10^3 - 3,1 \times 10^4$ kob/tane fındık arasında değişirken ilk dilüsyonlardan ekilen 32 petriden sadece 4'ünde 7 adet *A.flavus* kolonisi gelişmiştir. Bu da yöre fındıklarında veya deneme fındıklarında *A.flavus*'un yaygın olan funguslar içinde olmadığını göstermektedir. Bu durum *A.flavus*'un yörede en yaygın funguslar arasında olmadığını bir ölçüsü olarak kabul edilebilir. Tunail(2000) ve Heperkan(2003)'de *A.flavus*'u Türkiye fındıklarında yaygın olan küfler arasına koymamaktadır.

Bu çalışmada kullanılmak üzere yöreden getirilen fındık ve toprak örneklerinden *A.flavus* izole edilmemesi üzerine TUBITAK MAM'ın kültür koleksiyonundan 3024 ve 332 no'lu *A.flavus* kültürleri temin edilmiştir. Penetrasyon çalışmasında bu kültür koleksiyonundan temin edilen 3024 no'lu *A.flavus* suşu kullanılmıştır.

Denemede kullanılan kabuklu ve iç kara fındıklarda ortalama tane büyüklüğü sırasıyla 2,63 ve 1,31 g olurken bu değerler tombul fındıklarda sırasıyla 1,31 ve 0,80 g olmuştur. Fındıkların ağırlıklarının dağılımına ait standart sapma 0,21-0,35 g arasında, değişim katsayısı ise %13,27-26,61 arasında değişmiştir. Bu durumda fındık büyüklükleri arasında yaklaşık 2-3 kata yakın ağırlık farkı olduğu söylenebilir. Fındıklar herhangi bir kalibrasyona tabi tutulmadığından tarafımızdan yapılan depolama denemesinde de olduğu gibi kullanılmıştır. Büyüklük farkı mutlaka inokülasyonda tane başına düşen spor miktarını etkilemiş olabilir. Ancak bu miktar hiç bir zaman 3-10 kat gibi 0,5-1 logaritmik devre boyutunda olmayacaktır.

İç ve kabuklu fındıklarda inoküle edilmiş iç ve kabuklu fındıkların fungal yükünü belirlemek amacı ile yapılan ekim sonuçları çizelge 4.11 ve 4.12'de verilmiştir. Burada görüleceği üzere inoküle edilmemiş fındıklarda fungal yük $5,2 \times 10^3 - 3,1 \times 10^4$ kob/adet fındık değişirken *A.flavus* kolonisi sadece 4 örneğe ait 7 petride 1'er adet olarak görülmüştür. *A.flavus*'la inoküle edilen fındıklarda yüzey florasının hemen hemen sadece *A.flavus*'tan ibaret olduğu görülmüştür. Bu örneklerde *A.flavus* yükü $1,1 \times 10^5 - 6,1 \times 10^5$ kob/adet fındık düzeyinde olmuştur. Buna dayanarak inoküle edilen fındıklarda *A.flavus* yükünün hemen hemen tarafımızdan yapılan aşılama ile elde edildiği söylenebilir.

Fındıklar denemeye başlamadan önce tek tek stereo mikroskop altında incelenerek herhangi bir çatlak veya delik olup olmadığı belirlendikten sonra materyal olarak alınmış, çatlak veya zedeli olanlar kullanılmamıştır. Buna göre çalışmada ekilen bu sporların sağlam kabuğu geçerek içe ulaşıp ulaşmadığı incelenmiş olacaktır.

İç fındıklar %96 NR'li ortamda 2 hafta depolanmışlardır. Depolama sonunda *A.flavus* ile enfekte olan tane miktarları(%) çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi inoküle edilmemiş kara ve tombul fındıklarda 25'er taneden sadece 1'er tanede %4 enfeksiyon/kolonizasyon meydana gelirken inoküle edilenlerden 7. gün örneklerinde %84-96 13.gün örneklerinde ise tanelerin %96-100'ünde *A.flavus* kolonizasyonu görülmüştür. Buna dayanarak iç fındık yüzeyine inoküle edilen *A.flavus* sporları 1-2 hafta içinde iç fındık tanelerinin hemen hemen tamamını enfekte etmiştir. Bunu iç fındığı fungal istilaya karşı koruyan herhangi bir bariyeri olmadığı şeklinde değerlendirebiliriz. İkinci olarak deneme ortamı olan %96 NR sağlayan tuz çözeltisi *A.flavus*'un gelişmesi için yeterli bir ortam hazırladığı şeklinde değerlendirilebilir. Çizelge 4.3'de *A.flavus* enfeksiyonunun inokülasyon ve çeşide bağlı olarak değişimine ait varyans analiz tablosu yer almaktadır. Burada görüldüğü gibi kabuksuz iç fındıklarda çeşit *A.flavus* kolonizasyonunda önemli bir etken değildir($p=0,675$). Buna karşılık inokülasyon istatistiki olarak çok önemli bir etkendir($p=0,000$). Başka bir deyişle fındıklarda iç taneye penetre olarak gelişen *A.flavus* tarafımızdan inoküle edilen kültürdür.

Kabuklu fındıklarda depolama denemesi 125 gün sürmüştür. Depolama süresince tanelerde *A.flavus* enfeksiyonunun değişimi çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi kara fındıklarda inoküle edilmemiş olan hiçbir tanede *A.flavus* kolonizasyonu gözlenmemiştir. İnoküle edilmemiş tombul fındıklarda ise sadece 27. gün örneklerinin birer tanesinde *A.flavus* kolonizasyonu görülmüştür. Bu durum *A.flavus* sporlarının yeterli olmadığı durumlarda *A.flavus* enfeksiyonunun çok az düzeyde oluşabileceği anlamına gelebilir. Ancak tezin amacı inoküle edilen sporların iç taneye geçip geçmediğidir. Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi inoküle edilen fındıklarda 59 örneğin 13 tanesinde 7-66. günler arasında %4-100 arasında *A.flavus* kolonizasyonu gözlenmiştir. Önemli olan bu kolonizasyona neden olan fungusun kabuğu geçerek iç taneye ulaşıp ulaşmadığıdır. İnoküle edilen iç tanelerde son derece homojen bir kolonizasyon gözlenirken, kabuklu fındıklarda *A.flavus* enfeksiyonu bir rasgelelik göstermektedir. Bu dağılıma ait varyans analiz tablosu çizelge 4.5'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi inokülasyon sınırdaki etkili/önemli gözükürken ($p=0,037$) depolama süresi ve çeşit(kabuk kalınlığı anlamında) önemli bulunmamıştır($p>0,05$).

Kabuklu kara ve tombul fındıklarda *A.flavus* enfeksiyonunun zamana bağılı değişimi şekil 4.5 ve 4.6'da görülmektedir. Her iki şekilde de rasgele oluşan *A.flavus* enfeksiyonunun zamana bağılı olarak arttığını gösterir bir eğilim yoktur. Eğer *A.flavus* kabuğu geçerek içe ulaşmış olsa idi, depolama süresince zamanla bu enfeksiyonun artması gerekirdi. Bu nedenle inoküle edilen tanelerde görülen *A.flavus* enfeksiyonunu sporların gelişerek kabuğu aşması ile açıklamak pek mümkün görünmemektedir. Bu enfeksiyonlar bir anlamda deneysel çalışma şartları ile ilgili olabilir.

Depolamanın ilerlemesi ile tane yüzeyinde bile gözle görülür küf gelişimi meydana gelmiştir. Ekilen tanelerde ise tanenin yüzeyi tamamen hızla bir küf tabakası ile kaplanmaktadır. Tarla funguslarının bu yoğun gelişimini engellemek ve varsa *A.flavus* enfeksiyonunun görünür hale gelmesine imkan vermek için 41. günden itibaren yüzeyi sterilize edilen tanelerin yarısı %7,5 NaCl içeren PDA'lar üzerinde inkübe edilmiştir. Bu durumda taneler üzerinde hemen hemen sadece *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait funguslar gelişmiştir. Depolamanın 45-125. günleri arasında ekilen 32 örnekte inokülasyon olmayan bir örnekte yalnız 1 tanede *A.flavus* gelişirken inoküle edilenlerden 3 örnekte %15-100 arasında *A.flavus* enfeksiyonu görülmüştür. Bu dağılıma ait varyans tablosu çizelge 4.7'de görülmektedir. Çizelgeden görüleceği üzere *A.flavus* kolonizasyonunun örneklerdeki düzeyi üzerine inokülasyon, depolama süresi ve çeşitle bunları interaksiyonlarının hiçbirinin etkisi istatistiki olarak önemli olmamıştır ($p>0,05$).

Kabuklu fındıklarda toplam fungal kolonizasyonun depolama süresine bağılı olarak değişimi çizelge 4.8 ve 4.10'da , bunlara ait istatistiki değerlendirme çizelge 4.9 ve 4.11'de verilmiştir. Çizelge 4.8 ve 4.9'un incelenmesinden görüleceği üzere toplam fungal enfeksiyon ilk iki hatta %80-100 arasında değişirken 3. haftadan itibaren tüm örneklerde %100 olmuştur. Toplam fungal enfeksiyonun zamana bağılı bu artışı çizelge 4.9'da görüldüğü gibi istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Yapılan gözlemlerde enfeksiyonun büyük bir kısmı tarla funguslarına aittir. Bu durumda çok fazla nem ihtiyacı olan tarla funguslarının gelişme bulduğu bir ortamda daha az neme ihtiyaç duyan *A.flavus* sporlarının gelişmesi düşünülemez. Bu durum %96'lık NR'li ortamda *A.flavus* sporlarının kabuğu geçemediği veya onlar geçene kadar ortamdaki diğer fungusların tamamen ortama hakim olduğu şeklinde de değerlendirilebilir.

Diğer bir önemli konu inoküle edilen *A.flavus* sporlarının ilerleyen depolama sürecinde diğer fungal gelişme veya başka nedenlerle yok olup olmadığıdır. Bu amaçla deneme başlangıcında ve sonunda kabuklu fındıkların yüzeyinde *A.flavus* sayısı fındıkları dilüsyon çözeltisinde çalkalayıp bu çözeltiden yapılan ekimler ile incelenmiştir. Çizelge

4.11’de görüldüğü gibi inoküle edilmeyen kabuklu fındıklarda yüzey fungal yükü $1,3 \times 10^5 - 6,1 \times 10^5$ cfu/adet.fındık arasında olmuştur.

Depolamanın 125. gününde ise çizelge 4.13’de görüldüğü gibi toplam fungal yük $2,0 \times 10^6 - 9,6 \times 10^6$ cfu/adet.fındık düzeyine yükselmiştir. Bu yükseliş 2 logaritmik devreden biraz daha yüksektir. Yüzeyde fungal yükün artması ortam şartlarının fungal gelişmeye imkan verdiği şeklinde değerlendirilebilir. Depolama sonunda fındık yüzeyinde *A.flavus* yükü çizelge 4.14’de görüldüğü gibi aşılana örneklerde $9,2 \times 10^4 - 2,6 \times 10^5$ kob/adet.fındık arasında değişirken inoküle edilmeyenlerde yüzey florası içinde *A.flavus*’a rastlanmamıştır.

Depolama denemesi başlangıcında yüzeye inoküle edilen *A.flavus* ile depolamanın 125. gününde yüzeydeki canlı kalan yük arasında fark görülmemektedir.

Sonuç olarak inoküle edilmeyenlerde *A.flavus* gelişmemiş inoküle edilenlerde ise *A.flavus* düzeyi artmamış veya azalmamıştır.

Bu çalışmada fındıkların depolama ortamında nem kazanıp kaybetme durumlarını da ortaya koymak için deneme kavanozlarına konulan fındıklar başlangıç anında ve analiz için çıkarıldıkları an tartılmışlardır. Başlangıca göre analiz anına kadar geçen depolama sürecinde % ağırlık değişimleri şekil 4.7 ve 4.14 de gösterilmiştir. Tüm şekillerde görüleceği üzere bir iki istisna hariç tüm örneklerde değişim pozitif doğrudur. Buna göre depolama boyunca fındıkların ortamdan nem aldığı ve dolayısıyla yüzeylerinin fındığın geri kalan kısmına göre daha nemli olduğu ve fındığın depolama sırasında kurumadığı söylenebilir. Depolama sürecinde kabuklu ve iç tanelerin yüzeyinde fungal gelişim hatta depo funguslarının gelişimi bu nem artışını doğrulamaktadır.

Sonuç olarak yapılan bu depolama denemesinde kabuksuz taneler kolaylıkla aşılana *A.flavus* ile enfekte olurken, sağlam kabuklu fındıklarda %96 NR’li ortamda *A.flavus*’un kabuğu geçerek iç taneyi enfekte ettiğini söylemek zordur.

Bu durum fındık kabuğunun nemli ortamda *A.flavus* sporlarının çimlenerek iç tanede gelişmesinin önünde önemli bir engel olduğunu ve Karadeniz bölgesinde yaygın olan fındığın kabuklu depolanmasının doğru bir yöntem olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Açkurt, F., 1996, Fındığın Beslenme ve Sağlık Açısından Değerlendirilmesi. *Kuru Meyve Ticareti Dergisi*, Mart, No:2. 26.
- Alperden, İ., 1985, Gıdalarda Küfler; Sağlık ve Kaliteye Etkileri. *Gıda Teknolojisinde Yeni Gelişmeler Sempozyumu*. ODTÜ Mühendislik Fakültesi. Ankara. 197-215.
- Altay, K., 1986. *Fındık Tarımı*. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Teşkilatlanma ve Destekleme Genel Müdürlüğü. Yayın No:Genel 142, TEDGEM-12. Ankara, 1986.
- Aluç, M.; Aluç, S., 2003, Akçakoca, Ordu ve Giresun Yörelerinde Yetiştirilen Fındıklarda Aflatoksin Düzeyinin Belirlenmesi Üzerine Bir Çalışma. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*. 18-19 Eylül 2003, İstanbul. 60-67.
- Anonim, 2002, *Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkındaki Tebliğ*. Tebliğ No:2002-63. 32 Eylül 2002 tarihli Resmi Gazete, No: 24885.
- Anonim, 2003, <http://www.findik.com./turkfindikcesitleri.asp>
- Anonim, 2004, <http://www.fiskobirlik.org.tr/findik ve aflatoksin.htm>
- Anonim, 2006, http://www.food.oragonstate.edu/water/a_w.html
- Aşkın, O., Köşker, Ö., 1980. İncirlerde aflatoksin teşekkülü üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Diploma Sonrası Tez Özetleri*, 1(1):226-241.
- Betina, V., 1989, *Mycotoxins Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, Amsterdam.473.
- Boyacıoğlu, D., Gönül, M., 1986. Mikotoksin Tayin Metodolojisi. *Ege Üniv.Müh.Fak.Dergisi*, 4(2):87-95.
- Çoksöyler, N., 1987, *İçel Yöresinde Yetiştirilmekte Olan Yerfıstıklarında Aflatoksin Oluşumu Üzerinde Araştırmalar*. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğü, Ankara. 28.
- Çoksöyler, N.; Özkaya, Ş.; Boncuk, H., 1993. Bulgurda Aflatoksin Oluşma İmkânının İncelenmesi. *Gıda Dergisi*, 18(2):89-95.
- Detroy, R. W., Lillehol, E. B., Ciegler, A., 1971. Aflatoxin and related compounds, Chapter 1. *Microbial Toxins*. (Editors: Ciegler, A, Kadis, S., Ajl, S. L.).
- Eke, D., Gökten, D., 1987. Kabuklu Fındıklarda *A.flavus* Gelişmesi ve Aflatoksin Oluşumu. *Gıda Sanayi*, 4:36-43.
- Halkman, A., Gürgün, v., 1990. *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri*. Gıda Teknolojisi Derneği, San Matbaası, Yayın No:7, Ankara.147.

- Heperkan, D., 2003, Gıdalarda Mikotoksinler ve Ülkemiz Açısından Önemi. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*. 18-19 Eylül 2003, İstanbul. 1-8.
- Heperkan, D., Karbancıoğlu, F., Dalkılıç, G., 2003. *Gıdalarda Mikotoksinlerin Önlenmesi*. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. 18-19 Eylül 2003. İstanbul. 165-196.
- Hesseltine, C.W., 1976. *Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods and Feeds*. J. V. Rodricks. Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. American Chemical Soc. Washington D. 1-22.
- Karapınar, M., Gönül, Ş., 2000, *Gıda Kaynaklı Küf İntoksikasyonları*. Gıda Mikrobiyolojisi. Ege Üniv. İzmir. 152-162.
- Karapınar, M., 1984, *Gıdalarda Küf Bozulmaları*. Ege Üniv. Müh. Fak. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 2(1):81-95.
- Karapınar, M., 1981, Mikotoksinler. Ege Üniv. Müh. Fak. *Gıda Fak. Dergisi*, 2(1):157-167.
- Özkaya, Ş., Çoksöyler, N., 1988. Sağlam Kabuklu Fındıkta *Aspergillus flavus*'un Penetrasyonu ve Toksin Oluşumu. *IX. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 21-23 Eylül, 1:479. Sivas.
- Özyaral, O., 2003, Mikotoksinlerin Sağlık Üzerine Etkileri. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*. 18-19 Eylül 2003, İstanbul. 126-132.
- Pitt, I. J., Hocking, A. D., 1985. *Fungi and Food Spoilage*. CSIRO, Division of Food Research, Academic Press, Sydney. 407.
- Raper, K. B., Fennel, D. I., 1977. *The Genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York. 685.
- Samson, A. R., Hoekstra, E. S., Vanoorshot, C. A. N., 1984. *Introduction to Food Borne Fungi*. In Academy of Arts and Science, Netherlands. 248.
- Sert, S., 1991, Karma Yemlerde Aflatoksin Oluşum Potansiyeli. *Gıda Dergisi*, 16(2):139-144.
- Topal, Ş., 1984, Gıda Maddelerinden Ayrılan (İzole edilen) ve Tanınan (identifiye edilen) Küfler Üzerinde Araştırmalar. *Gıda Dergisi*, 9(1):254-261.
- Topal, Ş., 1996, Küflerle Oluşan Gıda Riskleri ve Önlenmeleri. *Kuru Meyve Ticareti Dergisi*. Eylül, No: 53.
- Tosun, A., 1988, *Fındıklarda Aspergillus flavus*'un Penetrasyonu ve Aflatoksin Oluşumu. Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış). 19 Mayıs Üniv. Fen Bilimleri Ens. Samsun.
- Tunail, N., 2000, *Mikrobiyal Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Zir. Fak. Gıda Müh. Böl. Ankara. 81-84.

Çoksöyler, N., Özkaya, Ş., Günal, S., Elden Taydaş, E., Atayeter, Y., 1993. Türkiye’de Üretim Bölgelerinde Depolanan Fındıklarda Fungal Enfeksiyon Düzeyinin Tesbiti Üzerine Bir Araştırma. *Kükem Dergisi*, **16**(1):1-9.

ÖZ GEÇMİŞ

1980 yılında Gaziantep'in Nurdağı ilçesine bağlı Sakçagözü Bucağı'nda doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 1999 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne girdi ve 2003 yılında mezun oldu. 2003 yılının Eylül ayında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.