

A. Ü. Veteriner Fakültesi Besin Kontrolü ve Teknolojisi
ve

Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Kürsüleri

Prof. Dr. Zeki Tolgay

Prof. Dr. Sabri Dilmen

**PIYASADA SATILMAKTA OLAN BAZI KARMA
YEMLERDE VE YEM HAM MADDELERİNDE
AFLATOXİN B₁ ARAŞTIRMALARI**

M.A. Demirer*

M. Akkılıç**

E. Özalp***

Ş. Kaymaz****

B. Dinçer*****

E. Akşehirli*****

**The Investigation of Aflatoxin B₁ in Some Mixed
Animal Feeds and Feed Raw Materials
Marketed in Turkey**

Summary:

This study was conducted to determine aflatoxins in some mixed animal feeds and feed raw materials harvested and manufactured in Turkey.

Totally 92 samples sended to Animal Nutrition Department of Veterinary Science Faculty, University of Ankara, were analyzed.

*Only in one sample, chicks feed, showed, aflatoxin B₁ in about 30 ppb. In this sample, *Aspergillus flavus* Link, *A. fumigatus* Fres and some *Penicillium* species were isolated. Aflatoxin producing ability of *A. flavus* Link was found very high.*

*According to these results, the animal feeds must be kept under controlled hygenic conditions at every stages from harvesting till consuming. Otherwise, *Aspergillus* species could be grow fast and produced toxin in them very easly.*

* A.Ü. Vet. Fak. Besin Kontrolü ve Teknolojisi Kürsüsü Prof.

** A.Ü. Vet. Fak. Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Kürs. Prof.

*** A.Ü. Vet. Fak. Besin Kontrolü ve Teknolojisi Kürsüsü Doç.

**** A.Ü. Vet. Fak. Besin Kontrolü ve Teknolojisi Kürsü. Dr.

***** A.Ü. Vet. Fak. Besin Kontrolü ve Teknolojisi Kürsüsü Dr.

***** Türk Silahlı Kuvvetleri Erzurum A. Tipi Mf. Gıda Knt. Uzmanı

Özet:

Araştırma, Ülkemizde üretilen bazı karma yemlerin ve yem ham maddelerinin aflatoksin B₁ yönünden durumlarını saptamak amacı ile yapılmıştır.

Materyal olarak, A.Ü. Veteriner Fakültesi Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Kürsüsü'ne muayene edilmek üzere, çeşitli kaynaklardan gönderilen 92 adet yem numenesi işlenmiştir.

Yalnız bir adet civciv yemi numunesinin 30 ppb miktarında aflatoksin B₁ içerdiği, bu numunede Aspergillus flavus Link. Aspergillus fumigatus Fres., ve bazı Penicillium türlerinin bulunduğu Aspergillus flavus Link'in bol miktarda aflatoksin B₁ ürettiği saptanmıştır.

Bulgular, hayvan yemlerinin üretiminden tüketimine kadar geçirdikleri her aşamada, hijyen koşullarının titizlikle uygulanması gerektiğini, aksi takdirde toksinojen aspergillusların süratle gelişerek toksin salgılayabilecekleri fikrini ortaya koymaktadır.

Giriş:

Hayvancılıkta başarı başlıca, yöreye uygun ırkın seçimi, kaliteli yemlerle yeterli ve dengeli beslenme ve iyi bakım ile sağlanır. Bunlardan herhangi birisi eksik veya yetersiz olursa hayvancılıkta başarıya ulaşmak söz konusu olamaz.

Ülkemizde, hayvan beslenmesinde her geçen gün önemi bir kat daha artan karma yemler ile bunların yapımında kullanılan ham maddelerin hijyenlik kaliteleri hakkında yeterince bilgili olmak, hayvancılığımızı kalkındırma açısından çok önemlidir. Herhangi bir hayvan yeminin formülünde bulunan maddelerin tür ve miktarı kadar kalitesi de büyük önem taşır. Zira son zamanlarda, diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de yemlerin küflenmesi sonucu meydana gelen mikotoksinler (mycotoxin'ler) ve bilhassa bunlar arasında toksisitesi çok yüksek olan aflatoksinler (aflatoxin'ler) hayvan besleme ile yem ve yem maddeleri biliminin ve yem sanayinin büyük bir sorunu haline gelmişlerdir. Yukarıda bildirilen nedenlerle bu araştırma, Ülkemizde üretilen bazı karma yemlerin ve ham maddelerin aflatoksinler yönünden durumunu saptamak amacı ile ele alınmıştır.

Küfler tarafından metabolizma ürünü olarak meydana getirilen toksinler, mikotoksinler diye tanınmaktadırlar. Bu mikotoksinleri içeren yemleri yiyen hayvanlarda, çeşitli hastalıklar ve zehirlenmeler meydana gelmektedir. Bu hastalıkların tümüne mikotoksikozisler (mycosoxicoses) denmektedir. 1960 yılında İngiltere'de 100.000 kadar hindi,

ördek ve sülün palazlarının ölümüne sebebiyet veren böyle bir toksikozis'in meydana çıkması ve bunun sebebinin aflatoxin olarak ortaya konulması çeşitli ülkelerde bu konuda yoğun araştırmaların yapılmasına neden olmuştur. (1, 25, 36, 37, 38). O yılık toksikozislere Brezilya'dan ithâl edilen ve *Aspergillus Flavus*'la enfekte olan yerfıstığı unlarının neden olduğu anlaşılmış ve yapılan ekip çalışmaları sonucunda bu yerfıstığı unundan *A. flavus*'un metabolik ürünü olan mikotoksin izole edilmiştir (1, 36, 37, 38). Aflatoxin adı verilen bu mikotoksin üzerinde yürütölen araştırmalar, bu toksin'in Aflatoxin B₁, Aflatoxin B₂, Aflatoxin G₁, Aflatoxin G₂ gibi 4 komponentten oluştugunu ve bu güne kadar bilinen en kuvvetli karaçiğer karsinojen maddesi olduğunu ortaya koymuştur. Böyle toksinleri kilogramında 50 mikrogram içeren yemlerle beslenen süt ineklerinin sütüyle de aflotoxin'in hidroksi aflatoxin olarak iki komponent halinde cixtre edildiği saptanmış ve bunlara da Aflatoxin M₁ ve M₂ adları verilmiştir. Daha sonraki araştırmalar hidroksi Aflatoxinlerden Aflatoxin B_{2a} ve G_{2a} nın da var olduğunu göstermiştir (2, 4, 5, 13, 30, 31, 32).

Konunun aktüel hale gelmesi üzerine yoğunlaşan araştırmalar, bu gibi aflatoksikozis'lere sadece *Aspergillus flavus*'un değil, aynı zamanda aflatoxin üreten diğer *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium puberulum*, *Penicillium variable*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium citrinum* ve bazı *Rhizopus* türlerinin de neden olabileceğini ortaya koymuştur (3, 9, 14, 18, 20, 23). Diğer taraftan *Aspergillus*'lardan başka *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Hymenopsis* ve *Rhizopus*'lara ait diğer birçok mantar türlerinin ürettikleri mikotoksinlerin de mikotoksikozislere neden oldukları eksperimental çalışmalarla ortaya konmuştur.

İngiltere'de hindi ve ördek palazlarında oluşan olaylara, benzer zehirlenmeler daha sonra tavuklarda ve domuzlarda da görölmüştür (16, 19). Yerfıstığından başka diğer yem maddelerinin de, örneğin; pamuk tohumu, soya fasulyesi gibi yağlı tohumların ve mısır, pirinç, arpa, buğday akdarı gibi tanelerin de aflatoxinleri içerdikleri tesbit edilmiştir (8, 21, 22, 23, 26, 27, 39).

Küflü gıdalarla beslenen hayvanların sütlerinde, yumurtalarında ve etlerinde toksin ve toksin artıklarının tesbit edilmesi sonucu, yem maddelerinin küf mantarlarından yoksun olmasının, hayvan sağlığı kadar insan sağlığı için de büyük önem taşıdığı ortaya konulmuştur (15, 20/1, 20).

Bu nedenle aflatoksinler üzerinde, sistematik ve boyolojik araştırmaların yanısıra fiziko-kimyasal, biyokimyasal yönden de birçok araştırmalar ve yayınlar gün geçtikçe daha da yoğunluk kazanmaktadır (6, 7, 10, 12, 17, 24, 28, 33, 34, 35, 40).

Yerfıstığı yetiştirilen bütün Afrika, Amerika ve Asya topraklarında pratik olarak mevcut olan *Aspergillus flavus*'lar yer fıstığının yalnız içlerinde değil, zar ve kabuklarında da oldukça fazla miktarda bulunurlar. Eğer, ısı ve rutubet şartları uygunsa *Aspergillus flavus*'un sporları gelişmesine başlayarak filamentlerini (ipliklerini) yarıklardan yahut kılıf deliklerinden içeriye sokup, tanenin içinde gelişmelerine devamla toksinlerini salgırlar. Sparların bu bulaşmasında diğer etkenlerin yanısıra insektler de önemli rol oynarlar. Bu bakımdan üretim yerlerinde mahsül alınmadan evvel daneler kontamine olmuş olabilirler. Daha sonra, mahsüllerin yığın halinde saklanmaları veya gemilerle nakil edilmeleri sırasında *aspergillus* miselleri kolaylıkla gelişebilirler. İşte bu dönemde de bulaşma görülebilir (22/1). Jacquet ve Ark. (22, 22/1) çeşitli yemler üzerinde yaptıkları araştırmalarında, Fransa'da satın alınan yerfıstığı küspelerinin % 90'ının Aflatoksin içerdiğini ve bunlardan ekserisinin oldukça düşük dozlarda, örneğin; 10 ila 30 mikrogram/kg., bazılarının ise oldukça yüksek dozlarda, örneğin; 1 kg.'da 1 miligram.'dan fazla miktarda ve bu numunenin birisinde ise 13 miligram/kg. olarak saptamışlardır. Araştırmacılar pamuk tohumu, soya, kakao ve keten tohumu küspelerinin bir kısmının da yerfıstığının kine yakın miktarda aflatoksinle bulaşık olduklarını tesbit etmişlerdir. Karma yemler üzerinde yaptıkları incelemelerin sonunda da bu yemlerde, içerdikleri ham maddelerin kontaminasyon derecelerine bağlı olarak değişik düzeylerde aflatoksin bulmuşlardır. Şöyleki; muayenne ettikleri 202 yem numunesinin % 76'sında, en az 2 mikrogram/kg., en fazla 2 miligram/kg. ve ortalama olarak da 180 mikrogram/kg.'da aflatoksin tesbit etmişlerdir. Neticede araştırmacılar, iyi görünüme sahip her türlü yemin aflatoksin yönünden bir anlam vermeyeceğini, ancak aflatoksin açısından yemlerin güvenilir olup olmadıklarının, analiz sonucunda anlaşılacağını belirtmişler ve satış sırasında aflatoksin içermediği sanılan bir yemin, daha önceki üretim aşamalarında *A.flavus*'un üreme koşullarına sahip olabileceğini, sonra da aflatoksinini yemde bırakarak yok olabileceği olasılığının daima göz önünde bulundurulmasını önermişlerdir. Sonuç olarak, o anda hiçbir *flavakumarin* içermeyen yiyecekler üzerinde *A. flavus*'dan başka toksin oluşturuvcu çeşitli küflerin üreyebileceği daima hatırlanmalıdır. Örneğin; küflü havuç, ekmeek, bisküvi, kakao,

çikolata, pasta hamurları ve fasulyede bu gibi durumlarla karşılaşılabılır. Bu bakımdan, insan beslenmesinden arta kalan ve normalde küflü bir görünüm arz etmeyen yiyeceklerin hayvan yemi olarak kullanılmamalarını önermişlerdir.

Hayvanlarda Aflatoksikozis:

Hayvanların aflatoksine olan duyarlılıkları çeşitli ırklara ve yaşa göre farklılıklar göstermektedir. Özellikle genç hayvanların yaşlılara, dişi ve gebe hayvanların diğerlerine oranla aflatoksinlere karşı daha duyarlı oldukları bildirilmektedir (16, 29, 32).

Kanatlılar arasında duyarlık derecesi çoktan aza doğru sırayla, ördek palazları, hindi palazları, sülün palazları, piliçler ve bıldırcınlardır. Ayrıca, New Hampshire piliçlerinin, Cornish Gome, Beyaz Rock, Beyaz Leghorn ve Rhode Island Red piliçlerine oranla daha hassas oldukları, memeliler arasında ise duyarlılık derecesi aynı şekilde çoktan aza doğru, 3-12 haftalık domuzlar, gebe domuzlar, danalar, yağlı domuzlar, sığırlar ve koyunlar şeklinde sıralandığı, sığır ve koyunların aflatoksine karşı oldukça dayanıklı oldukları bildirilmektedir (9, 16, 29, 32).

Aflatoksinlerin Hayvanlarda Oluşturduğu Klinik Septomlar ve Patolojik Bulgular:

Aflatoksinlerin hayvanlarda oluşturduğu ilk klinik belirtiler iştahsızlık, ağırlık kaybı ve verim düşüklüğüdür. Bunların haricinde genellikle ölümden birkaç gün evveline kadar belirli hiçbir septom görülmez Genel olarak, hayvanlarda görülen patolojik bulguların en önemlilerinden birisi karaciğer lezyonudur. Çiflik hayvanlarının çoğunda karaciğerde makroskopik lezyonlar, renkte solgunluk veya tamamen renksizlik görülür. Bunların yanısıra az derecede visceral membranlarda ödem ve acsitiesler de oluşabilir. Türler arasında özel olmayan fakat karakteristik olan bazı klinik septom ve patolojik bulgulara da rastlamak mümkündür (9, 16).

1- Hindi ve Ördek Palazları:

Bunlarda aflatoksikozis sonucu şiddetli bir titreme meydana gelir. Bacak ve parmak arası zarlarının pembe renkleri giderek soluklaşır ve sonra da kabuklaşırlar, bu arada topallık da oluşur.

Akut zehirlenmelerin sonunda, benekli ve büyümüş bir karaciğer tablosu ortaya çıkar. Karaciğerin portal bölgesinin etrafında nekrozlar, kanama ve yağ birikintileri oluşur. Canlı kalanlarda aşırı bir safra kanalı proliferasyonu görülür.

% 5 gibi düşük bir düzeyde toksik yerfistığı içeren rasyon ile 14 aydan fazla süre beslenen ördek palazlarının karaciğerinde tümörlerin oluştuğu bildiriliyor (9, 16).

2- Piliçler:

Piliçler, ördek ve hindi palazlarına oranla aflatoksine karşı daha az hassastırlar ve bunlarda mortalite oldukça düşüktür. İlk birkaç hafta içinde büyümenin durması ilk görülen klinik septomdur. Toksik yerfistığı unu katılan yemlerle beslenen 1 günden 9 aya kadar yaşlı Rhode Island Red piliçleri üzerinde yapılan araştırmalar ilk üç hafta içinde ölüm vak'alarının çokaz olduğunu ve bu devrede ölenlerin karaciğerlerinin solgun ve katı bir durum aldığını, böbreklerinin ise hafifçe büyüdüğünü, üç ay sonra ölenlerin karaciğer ve böbreklerindeki lezyonların oldukça ilerlemiş olduğunu ve bu süreden sonra öldürülenlerde ise bu organların normal olduklarını, fakat bazılarının karaciğerlerinde iğne başı büyüklüğünde münferit lezyonların şekillenmiş olduğunu ortaya koymuştur. Hayvanların yumurta verimlerinde herhangi bir anormallik görülmemiştir. İlk 2-3 haftalık hasta yavrularda büyüme ile orantılı olarak mikroskopik lezyonların çabucak değiştiği ve hepatik hücre dejenerasyonu ile safra kanalı proliferasyonu tablosunun oluştuğu bildirilmektedir (16).

3- Sığırlar:

Sığırlarda ancak aflatoksikozisin son safhalarında karakteristik bulgular meydana gelir. Örneğin; ıkınma, kazıntı ve prolapsus şekillenmesi. Yaşlı sığırların, danalara kıyasla aflatoksine daha dayanıklı oldukları laktasyonda olan ineklerin toksik yemlerle beslendiklerinde 2. ve 3. günden itibaren sütlerinde gözle görülebilir bir azalmanın oluştuğu, bu gibi yemlerle beslenen ineklerin ise normal olarak doğurduğu, yavruların büyümesinin normal olduğu, herhangi bir klinik septom göstermedikleri, fakat, 4. ayda bazı ölüm vak'alarına rastlanıldığı bildirilmektedir. Ölen yavruların analarının günlük yemlerinde 1.5 mikrogram aflatoksin B₁ saptanmıştır. Günde bu miktar aflatoksin alan ineklerin yavrularında görülen ölüm veya büyümelerindeki durmanın nedeni, bu ineklerin sütleri ile oldukça

yüksek miktarlarda aflatoksin (litrede 0.08-0.3 mg) salgılamalarıdır. Deney ve gözlemler bir yaşına kadar olan danaların, et sığırlarına oranla aflatoksikozise daha hassas olduklarını göstermektedir. Danalar üzerinde yapılan otopsi sonuçları, genellikle karında su toplanması, organlarda ödem ve karaciğerde fibrosistir. Karaciğerde görülen mikroskobik lezyonlar: safra kanalı proliferasyonları, merkezi lobular ve hepatik venlerin kronik endofilebitisleri, çoğu anormal büyüklükte nukleusları içeren parenchymatic hüctelerin şekil ve büyüklüklerinde dikkat çekici değişiklikler ve karaciğerin lobuler yapısına basınç yapan ve ciğerin fonksiyonunu zorlaştıran yaygın fibrosislerdir (3, 9, 16).

4- Koyunlar:

Koyunların diğer çiftlik hayvanlarına kıyasla aflatoksikozise karşı dirençli oldukları, normal şekilde kontamine olmuş yemlerle beslenenlerde genellikle aftatoksikozis tablosu şekillenmediği, ancak 60 ppm miktarında aflatoksin B₁ içeren yemlerle 4-6 hafta süre ile beslenen deneme hayvanlarında experimental olarak aflatoksikozis şekillenebileceği bildirilmektedir.

Hayvan Yemlerinde Müsaade Edilen Aflatoksin Miktarları:

Buzağı ve en çok 4 aylık danalarda 0,22, 0,44 ppm aflatoksin içeren yemlerin, bu hayvanların canlı ağırlıklarında, yem tüketimlerinde oldukça önemli derecede azalma meydana getirdiği bilinmektedir. 0,66 ppm. aflatoksinden daha aşağı miktarda aflatoksin içeren yemlerle beslenen 2-2,5 yaşındaki sığırlarda yem tüketimi veya canlı ağırlık artışında bir değişiklik olmadığı, yaş arttıkça aftatoksine karşı olan direncin de arttığı, 0,002, 0,2, 0,4 ve 0,8 ppm aflatoksin içeren rasyonlarla beslenen etlik piliçler üzerinde yapılan araştırmalarda, aflatoksin miktarının artması ile orantılı olarak canlı ağırlık artışında ve yem tüketiminde bir azalmanın olduğu, tecrübenin 10. haftasında öldürölen özellikle 0,2-0,8 ppm miktarlarda aflatoksin alan piliçlerin histolojik muayenelerinde lenfatik hücre proliferasyonu ve regenerasyon nodüllü safra kesesi proliferasyonunun göröldüğü, ördek ve hindi palazlarında 6 haftalık süre ile yapılan karşılaştırmalı besleme tecrübelcinde ortalama olarak 0,3-0,6 ve 0,85 ppm aflatoksin B₁ içeren yemlerle beslenen ördek palazlarının toksine daha fazla hassas oldukları, fakat aynı dozu alan hindi palazlarında hiç ölüm olmadığı ve her iki türün de öldüröldükten sonra yapılan hitopato-

lojik muayenelerden aflatoksikozis lezyonlarının en düşük dozları alan hayvanlarda dahi şekillendiği kaydedilmektedir (16).

Yapılan bütün bu araştırmaların sonucunda, Dünya Gıda ve Tarım örgütü ile Dünya Sağlık Örgütü tarafından müsaade edilen en fazla aflatoxin miktarı 1 kg. yemde 30 mikrogramı aşmaması gerektiği şekilde önerilmektedir. Ayrıca, ördek palazları için bu miktarın bile çok olduğu, mümkünse bunların yemlerinin aflatoksinden tamamen yoksun olması gerektiği bildirilmektedir (16).

Materyal:

Materyal olarak, A.Ü. Veteriner Fakültesi, Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Kürsüsü'ne muayene edilmek üzere çeşitli kaynaklardan gelen ve dökümü Çizelge I'de bildirilen 92 adet yem numunesi işlenmiştir.

Çizelge I: Aflatoxin yönünden incelenen numune çeşidi ve sayısı

Numune çeşidi:	Numune sayısı:
Etlik civciv yemi	10
Etlik piliç yemi	6
Yumurta civcivi yemi	12
Piliç büyütme yemi	5
Piliç geliştirme yemi	3
Yumurta tavuğu yemi	12
Kafes tavuğu yemi	1
İş hayvanı yemi	1
Buzağı-kuzu büyütme yemi	5
Besi yemi	10
Süt yemi	10
Mısır	3
Balık unu	4
Kemik unu	1
Et-kemik unu	1
Tavuk mezbaha kalıntısı unu	1
Pamuk tohumu küspesi	2
Ayçiçeği küspesi	1
Soya fasulyesi küspesi	1
Arpa	1
Buğday	1
Kabak (küflenmiş)	1

92

Metodlar için gerekli reaktif, malzeme ve aletler:

1- Solventler: Metanol, Kloroform, Hekzan (68-69°C), susuz dietil eter (alkol % 0.01'den az), Benzen, Acetonitrile, % 50'lik H₂SO₄.

2- Sodyum klorür (ACS saflık derecesinde)

- 3- Sodyum klorür solusyonu (% 5)
- 4- Sodyum sülfat (ACS saflık derecesinde ve susuz)
- 5- Sodyum sülfat solusyonu (doymuş)
- 6- Kurşun asetat (ACS saflık derecesinde, nötre ve 2 sulu)
- 7- Kurşun asetat solusyonu (% 40)
- 8- Aflatoksin standartları
- 9- Filtre kâğıdı (Whatman No I yahut Carl Schieicher schull
2043 a)
- 10- Numune şişeleri: Dipleri sivri, 8 ml. kapasiteli.
- 11- Mikser
- 12- Azot bombası, sıcak su banyosu (termostatlı ve elektrikli)
ve su trompu sistemi
- 13- İnce tabaka kromatografisi takımı (Desega)
- 14- Mikrometrik şiringa takımı (Agla marka)
- 15- Uzun dalga ultra viyola lâmbası
- 16- Silica-Gel-G-Merck: (İnce tabaka kromatografisi için)
- 17- Hot playte (elektrikli ve termostatlı)
- 18- Elektrikli fırın (50-250° C'de çalışır).
- 19- Pipet doldurucusu.
- 20- Ayırma hunileri (250-500 ml. lik) beherglaslar 100 ml. lik
huniler, 7 cm. ve 15 cm. çaplarında, erlenmayerler (250 ml. lik)
pipetler 1,2,10 luk, ölçü silindirleri (100 ml. lik).
- 21- Diğer lâboratuvar malzemeleri.

Metod:

Demirer (11) tarafından değiştirilerek geliştirilen metod aşağıda tarif edildiği gibi uygulanmıştır.

Numuneler iyice öğütüp homojenize edildikten sonra, 10 g. alınıp mikserin kavanozuna konuldu. Sonra içine 44 ml. damıtık su, 60 ml. methanol, 1 g. tuz ve 2 g. diatome toprağı ilâve edildi. Mikser yüksek devirle 2 dakika çalıştırıldıktan sonra durduruldu ve 3 ml. kurşun asetat solusyonu ilave edilerek alçak devirle 1 dakika daha çalıştırıldı. Tekrar durdurulup 3 ml. doymuş sodyum sülfat solusyonu

ilâve edilerek 1 dakika daha alçak devirle karıştırıldıktan sonra karışım hemen süzgeç kâğıdından süzüldü. Süzüntü ayırma hunisine aktarılarak içine 50 ml. hexan ilâve edildi. ve 30 saniye iyice çalkalandıktan sonra tabakaların ayrışması için bekletildi. Sonra alt tabakadaki metanol-su fazından 55 ml.'si 100 ml. lik silindire alınarak diğer bir ayırma hunisine aktarıldı. Silindir 5 ml. tuzlu su ile çalkalanarak huniye ilâve edildi.

Alınan 55 ml. ekstrakt numunenin yarısını temsil ediyordu. Temiz bir silindire 30 ml. kloroform alınarak bununla yukarıdaki silindir 3 defa çalkalandı ve ayırma hunisine aktarıldı. Yıkanan silindir sonra ayırma hunisinin altına yerleştirildi. Metanol su fazında bulunan aflatoksinleri kloroformla ekstre etmek için ayırma hunisi 1 dakika müddetle kuvvetle kalkalanıp birkaç dakika beklemeye bırakıldı. Fazlar ayrılınca aflatoksinlerin geçmiş bulunduğu alttaki kloroform fazı silindire aktarıldı. Ayırma hunisine tekrar 30 ml. kloroform konularak yine 1 dakika çalkalamadan sonra bir müddet bekletilerek ayrılan kloroform fazı evvelkinin üzerine konularak birleştirildi. İçerisinde artık aflatoksin kalmayan ayırma hunisindeki metanol- su fazı huninin ağzından dökülerek bertaraf edildi. Silindirdeki kloroform ekstresi tekrar ayırma hunisine aktarıldı silindir 50 ml. tuzlu su ile yıkanarak ayırma hunisine ilâve edildi. Kloroform ekstresini tuzlu su ile yıkamak için 1 dakika müddetle ayırma hunisi şiddetle çalkalanıp birkaç dakika bekletildi. Diğer taraftan 250 ml. lik bir erlenmayer alınarak üzerine 7 cm. çapında bir huni konuldu ve içerisine süzgeç kâğıdı yerleştirilerek üzerine 20 g. anhidr sodyum sülfad konuldu. Bu erlen, sonra ayırma hunisinin altına yerleştirilerek içerisine tuzlu su ile yıkanmış ve alt fazı teşkil eden kloroform ekstresi damla damla süzüldü. Sodyum sülfad ve süzgeç kâğıdını içeren huni 3'er ml. lik kloroformla 3 defa yıkandıktan sonra, kloroform ekstresinin toplandığı erlenmayer alınarak su banyosuna yerleştirildi. Vakum ve azot gazı altında 2-3 ml. kalıncaya kadar buharlaştırıldı. Sonra erlenmayer sistemden ayrılmadan su banyosundan çıkarıldı ve azot gazı altında soğutuldu. Soğutma sonucu 0,5-1 ml. kadar kloroform ekstresi kalabilecek şekilde buharlaşma ayarlandı. Sonra da erlenmayerdeki bu konsantre kloroform ekstresi numune şişesine aktarıldı. Erlenmayer 1'er ml. lik kloroformla 4 defa yıkanarak yine numune şişesine dikkatlice aktarıldı. Numune şişesindeki ekstre tekrar su banyosunda vakum ve azot gazı altında kuruyana dek buharlaştırıldı. Sisteme bağlı kalmak şartı ile banyodan çıkartılarak azot gazı altında soğutuldu ve ince tabaka kromatografisine tatbiki hazır duruma getirildi.

İnce Tabaka Kromatografisi:

Numunelerde aflatoxin araştırılması için ince tabaka kromatografisi kullanıldı. Bunun için önce, kromatografi plâkları (20×20cm.), 0,250 mm. kalınlığında Silica-Gel G- kaplandıktan sonra 105°C'de 2 saat aktive edildi. Sonra hazırlanan plâklara, numune ekstraktları 900 mikrolitre kloroform ile çözündürülerek aflatoksın standartları eşliğinde mikrometrik şırınga ile tatbik edildi.

Numunelerde kalabilecek eseri yağ ve yağda eriyebilir yabancı maddeleri bertaraf etmek için, plaklar önce dietil eter ile develope edildikten sonra karanlıkta çeker ocak içerisinde kurutuldu. Kurutulan plâklar daha sonra kloroform/metanol 97/3 V/V karışımında develope edildi ve sonra da kurutulularak uzun dalga ultraviyole ışığı altında incelendi. Standartların meydana getirdikleri lekeler ile karşılaştırılarak miktar tayini yapıldı.

Aflotoksin standartları ile aynı Rf. değerli herhangi bir mavi-mor floresan lekenin aflatoxin olup olmadığının doğrulanması için plâklar üzerindeki lekeler % 50 lik sülfürik asit ile muameli edilerek kontrolleri yapıldı.

Bulgular:

Aflatoksın yönünden muayene edilen 92 muhtelif yem numunesine ait analiz bulguları çizelge II'de verilmiştir.

Çizelge: II Numunelerde aflatoksın B₁'in varlığı

Numune sayısı	Plâkta mavi-mor leke		Aflatoksın B ₁	
	Oluşturan	Oluşturmayan	İçeren	İçermeyen
92	11 (% 11.95)	81 (% 88.05)	1 (% 1.09)	91 (% 98.91)

Tablonun tetkikinden de anlaşılacağı üzere numunelerin 11 tanesininde aflatoksın B₁ in Rf değerine tekabül eden bölgede mavi-mor lekelerin oluştuğu görülmüşse de bunların sülfürik asit ile yapılan doğrulamaların sonucunda birisi hariç diğerlerinin aflatoksın B₁ olmadığı ortaya konulmuştur. 61 numaralı civciv yemi etiketini taşıyan bu tek numunenin içerdiği aflatoksın B₁ miktarı, 30 ppb olarak saptanmıştır.

Bu araştırmanın ikinci bölümü olan diğer bir çalışmada daha geniş olarak açıklanacağı üzere bu numunenin mikroflarasının muaye-

nesinde *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus fumigatus* Fres ve *Penicillium*'un bazı türlerine raslanmıştır. *A. flavus* Link'in aflatoksin üreticisi olup olmadığı yönünden yeteneği araştırılmış ve bol aflatoksin B₁ üreticisi olduğu saptanmıştır.

Tartışma ve Sonuç:

Metodun tatbiki ile elde edilen ince tabaka damlatma solusyonu numune ekstraktlarında teşhisi zorlaştırıcı kirliliklere rastlanmamış olduğundan, kolon kromatografisi ile temizleme ve saflaştırma yapılmamış ve ayrıca çift yönlü ince tabaka kromatografisi uygulama zorunluluğu da duyulmamıştır.

Analiz sonuçlarımıza göre muayene ettiğimiz numunelerde aflatoksin B₁ yönünden sakıncalı bir duruma rastlanmamıştır. Sadece bir numunede tesbit edilen 30 ppb aflatoksin B₁ in tehlikeli bir durum arzetmediği ortadadır. Ancak numunede *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* Fres ve *Penicillium* türlerinin mevcudiyeti önemlidir. *Aspergillus flavus*'un toksinojen olduğu saptanmıştır. *Aspergillus fumigatus* ise bilindiği gibi patojen olup, ayrıca toksinojendir. *Penicillium*'larında bir çoğunun toksin hasil edebildiği araştırmalarla ortaya konmaktadır. Araştırmanın ikinci bölümünde daha etraflı olarak sunulacak olan diğer 7 numunede toksinojen aspergillus'lara rastlanması çok büyük önem arz etmektedir. Çünkü, bu toksinojen aspergilluslar fırsat buldukları anda yemde çoğalarak toksinlerini yeme salma olasılığını elde edebilecek, patojen olanlar da ayrıca hayvanlarda çeşitli hastalıklar meydana getirebileceklerdir.

Diğer taraftan, bulaşık yemin kiloğramında 33 mikrogramlık ve daha fazla aflatoxin mevcut olduğu zaman en az aflatoxin B₁ in hayvanın vücudunda metabolize olarak onun ürünü aflatoxin M₁ in süt içerisinde salgılandığı, ayrıca aflatoxinin yumurtlayıcı tavukların yumurtalarına ve gıda olarak yenen çeşitli hayvansal dokulara geçtiği dikkate alındığı takdirde hayvan yemlerinin üretiminden tüketimine kadar geçirdikleri tüm aşamalarda dikkatli olarak hijyen koşullarına uyulmasının zorunluluğu ortaya çıkmaktadır (13/1, 20/1). Buna uyulmadığı takdirde her an üremeğe, toksin vermeye hazır bir halde bulunan toksinojen aspergillus şuşlarının üreyerek yemlere toksinlerini salıvereceği ve böyle yemleri yiyen hayvanlarda da kütleli toksikasyonların meydana gelmesi olasıdır.

Literatür

- 1- **Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A., Sargeant, K. O, Kelly, J.** (1961) *A Toxic Factor in Brazilian Groundnut Meal*. Vet. Rec. 93, 428-429.
- 2- **Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A.,** (1962) *Groundnut Toxicity Aspergillus flavus toxin (aflatoxin) in Animal products*. Vet. Rec. 74. 863-854.
- 3- **Allcroft, R., Lewis, G.** (1963): *Groundnut Toxicity in Cattle: Experimental poisoning of Calves and a Report on Clinical Effects in Older Cattle*, Vet. Rec. 75. 487-493.
- 4- **Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A.** (1963). *Groundnut Toxicity: An examination for Toxin in Human Food Products from Animals Fed Toxic Groundnut meal*. Vet. Rec. 75, 259-263.
- 5- **Allcroft, R., Roberts, B.A.** (1968). *Toxic Groundnut Meal: The Relationship between Aflatoxin B₁ intake by Cows and Excretion of of Aflatoxin M₁ in Milk*. Vet. Rec. 82. 116-118.
- 6- **AOAC** (1975): *Natural Poisons AOAC, official Methods of Analysis*. 12 th Edition, Washington.
- 7- **Arda, M.** (1975) *Mikotoksinler ve Mikotoksikosis*. Vet. Hek. Dern. Dergisi 45, 3, 5-18.
- 8- **Borker, E. et al** : (1966) *Mycotoxins in Feeds and Foods*. Adv. Appl. Microbial. 8, 315-351.
- 9- **Bronchard, J.C.L.R.** (1969): *Pouvoir Pathogene spontane et experimental des aflatoxines*. These pour le doctorant vétérinaire, pages 97. Ecole Nationale Vétérinaire d'aflord R. Foulon Paris.
- 10- **Demirer, M.A.** (1972): *Ankara piyasasında satılmakta olan bazı süt ve süt ürünlerinde Aflatoxin araştırmaları*. 15. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 346. Hacettepe Üniversitesi Basımevi. Ankara.
- 11- **Demirer, M.A.** (1973): *Süt ve Süt mamüllerinde Aflatoxin M₁ ve B₁ aranması üzerinde araştırmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg. XX, 2-3, 421-443.
- 12- **Demirer, M.A.** (1973): *Sütle aflatoxinlerin ekstre edilmeleri ve süt ve süt mamüllerinde aflatoxin tayin metadlarında son gelişmeler*. A.Ü. Vet. Fak. Derg. XX, 2-3, 444-453.

- 13- **Fehr, P.M., Bernage, L., Varsilopoulos V.** (1968) *Effet de la consommation de Tourteau d'arachide pollué par Aspergillus flavus chez le ruminant en lactation. Le lait*, 48, 477, 377-392.
- Fischbach, H., Rodricks, J.V.** (1973): *Current Efforts of the Food and Drug Administration to Control Mycotoxins in Food Report on Control of mycotoxins in Food Presented by Henry Fischbact at the IUPAC -Sponsored symposium on Control of Mycotoxins, Goteberg, Sweden, August 22-22, 1972.*
- 14- **Frayssinet, C., Lafont, P.** (1969): *Production par des Aspergillus de Mycotoxines différenes des Aflatoxines. Anal. Inst. Past.* 116. 331-340.
- 15- **Goldblatt, L.A.** (1968): *Aflatoxin and its control. Economic Botany* 22, 51-62.
- 16- **Goldblatt, L.A.** (1972): *Aflatoxin. Scientific background, Control, and Implications. 2 nd Ed. Academic press, New York and London.* 1-472.
- 17- **Hamilton, P.B., Garlich, J.D.** (1972): *Failure of vitamin supplementation to alter the fatty liver syndome of laying hans caused by aflatoxin, Poultry Sci.*, 51: 688-692.
- 18- **Hamilton, P.B., Tung, H.T., Harris, J.H., Gainer, J.H., Donaldson W.E.** (1972): *The effect of dietary fat on aflatoxicosis in turkeys. Poultry Sci.*, 51: 165-170.
- 19- **Hintz, H. F., Booth, A.N., Cucullu, A.F., Gardner, H.K., Heitman, H.** (1967): *Aflatoxin Toxicity in Swine. Proc. Soc. exp. Biol Med.* 124, 266-268.
- 20- **Hodges, F.A., Zust, J.R., Smith, H.R., Nelson, A.A., Armbrrecht, B.H., Campbell, A.D.** (1964): *Mycotoxins: Aflatoxin isolated from penicillium puberulum. Science*, 145: 1439
- 20/ 1- **Jacobson, W.C., H.G., Wiseman** (1974): *The Transmission of Aflatoxin B₁ into Eggs. Poultry Sci.* 53, 5, 1743-1745.
- 21- **Jacquet, J., Boutibonnes, P., Teherani, A.** (1970): *Sur la presence des flavatoxines dans les aliments des animaux et dans les aliments d'origine animale destinés à l'home. Bull. Acad. Vét.* 43, 35-43.
- 22- **Jacquet, J., Bautibonnes, P., Téhérani, A.** (1970): *Fréquence actuelle des flavatoxines dans les aliments du bétail. Extrait du Procéc-verbal de la séeance du 11 février 1970: 187-200.*

- 22/ 1- **Jacquet, J.** (1973): *Les Aflatoxines ou flavacoumaines et leur propriétés. Cas du lait et des produits laitiers.* Technique laitière 28, 775, 27-29.
- 23- **Joffe, A.Z.** (1969): *Aflatoxin produced by 1626 Isolates of Aspergillus flavus from Groundnut Kernels and Soils in Israel.* Nature Lond. 221: 492.
- 24- **Kriz, H.** (1970): *The effect of aflatoxins on the vitamin A storage in livers of chickens.* Acta Vet. (Brno) 39: 131-134.
- 25- **Loosmore, R.M., Harding, J.D.J.** (1961): *A toxin Factor in Brazilian Groundnut Causing Liver Damage.* Vet. Rec. 73: 1362-1364.
- 26- **Loosmore, R.M., Allcroft, R., Tutton, E.A., Carnaghan, R.B.A.** (1964): *The presence of Aflatoxin in a sample of Cotton-seed cake.* Vet. Record 76: 64-65.
- 27- **Lopez, A., Crawford, M.A.**, (1967): *Aflatoxin Content of Groundnuts sold for human consumption in Uganda.* Lancet 2: 1351-1354.
- 28- **Osporne, D.J., Wyatt, R.D., Hamilton, P.B.** (1975): *Fat digestion during aflatoxicosis, in chickens.* Abst Poultry Sci. Assn., 64: 79
- 29- **Platonow, N.** (1965): *Investigation of the possibility of the Presence of Aflatoxin in Meat and liver of chickens Fed Toxic Groundnut Meal.* Vet. Rec. 77: 1028.
- 30- **Purchase, I.F.H.** (1966): *Aflatoxin in Milk, S.A. Medical Journal* 40: 774.
- 31- **Purchase, I.F.H., Steyn M.** (1967): *Estimation of Aflatoxin M in Milk,* AOAC, 50: 363-366.
- 32- **Purchase, I.F.H.**, (1967): *Acute Toxicity Of Aflatoxins M₁ and M₂ in one-day old Ducklings.* Fd Cosmet. Tloxicol, 5: 339-342.
- 33- **Romer, T.R.** (1972): *Determination of Aflatoxine in Mixed Feeds. Abstracts of the mycotoxin paper presented at the AOAC meeting in 1972, Washington. D.C. USA. Page 56, Abst. 211.*
- 34- **Romer, T.** (1976): *Methods of detecting mycotoxins in feeds and feed ingredients.* Feedstufst 48, 16, 18-21, 46.
- 35- **Romer, T.R., Dunmire, L.D.:** *A rapid Screening Method for Aflatoxin in Mixed Feeds. Yayınlanmamış. Ralston Purina Co., st. Louis MO 63188. (özel yazışma ile 1977'de elde edildi.).*

- 36- **Sargeant, K., Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A.** (1961): *Groundnut Toxicity*. Vet. Rec. 73: 865.
- 37- **Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A.** (1961). Nature, 192 (14807), 1096-1097
- 38- **Sargeant, K., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A., Allcroft, R.** (1961): *The assay of a toxic principle in certain groundnut meals*. Vet. Rec. 73: 1219-1223.
- 39- **Shotwell, O.L., Stubblefield, R.D.** (1972): *Collaborative Study of the Determination of aflatoxin in corn and soybeans* AOAC 55: 781-788.
- 40- **Smith, J.W., Hill, C.H., Hamilton, P.B.**, (1971): *The effect of dietary modification on aflatoxicosis in the broiler chicken*. Poultry Sci., 50: 768-774.