

SÜT YEMİ VE ÇİĞ SÜTTE AFLATOKSİN KALINTILARININ
KROMATOĞRAFİK YÖNTEM İLE ARAŞTIRILMASI*

Sezai Kaya**

**The investigation of aflatoxin residues in dairy feed and raw milk
by chromatographic method**

Summary: *This study was conducted to determine the levels of aflatoxin residues semi-quantitatively in dairy feed and raw milk.*

Experiments were carried out in 106 dairy feed and 38 raw milk samples. Samples were analyzed by thin layer chromatography after being extracted and cleaned up by the method of MESRIPOUR and NESHEIM.

Of 106 dairy feed samples 21 contained 0.0125 p.p.m. aflatoxin residues. Aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂, were found in 100, 33.3, 9.5, and 4.8 percent of the samples containing aflatoxin residues; respectively. The levels of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ were 0.008, 0.003, 0.0121 and 0.004 p.p.m., respectively.

It was determined that 5.7 % of the raw milk samples contained 0.0004 p.p.m. aflatoxin M₁.

It is concluded that the aflatoxin residues in dairy feed and raw milk are present in rather low level but aflatoxin residues are in high incidence in dairy feed.

Özet: *Bu çalışma, süt yemi ve çiğ sütte aflatoksın kalıntılarının düzeylerini ince tabaka kromatografisi (İTK) ile yarı-nicel olarak belirlemek amacı ile yapıldı.*

106 süt ineği yemi ve 38 çiğ süt örneğinde analizler gerçekleştirildi. Numünelerden aflatoksınler MESRIPOUR ve NESHEIM tarafından bildirilen yöntemle ekstrakte edilip, temizlendikten sonra İ. T. K.'de analiz edildi.

106 süt ineği yeminden 21'inde 0.0125 p.p.m. düzeyinde aflatoksın kalıntısı bulundu. Aflatoksın kalıntısı belirlenen örneklerin % 100'ünde AFB₁'e, % 33.3'ünde AFG₁'e, % 9.5'inde AFB₂'ye ve % 4.8'inde AFG₂'ye

* Bu çalışma aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir. (1982)

** Dr.med.vet. A.Ü.Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Birimi, Ankara-Turkey.

rastlandı. Aflatoksin kalıntısı bulunan tüm örneklerdeki aflatoksin çeşitlerinin düzeyi ortalama AFB_1 - 0.008, AFB_2 - 0.003, AFG_1 - 0.0121 ve AFG_2 - 0.004 p.p.m. olarak saptandı. Çiğ süt örneklerinin % 5.7'sinde 0.0004 p.p.m. düzeyinde AFM_1 bulundu.

Bulgular tartışıldı. Süt ineği yemi ve çiğ sütle aflatoksin kalıntısı miktarının düşük düzeyde olmasına karşılık yemlerde yaygın bir kirlenmenin olduğu ve bunun da uzun sürede hayvancılık endüstrisinde olumsuz etkiler yapabileceği kanısına varıldı.

Giriş

Karma yem, yem ilkel maddeleri ve çeşitli besin maddeleri, üretimden tüketime kadar, uygun olmayan koşullar altında bulduklarında mantarların üremesi için elverişli bir ortam oluştururlar. İlk zamanlarda, üreyen mantarların belirtilen bu besin maddelerinin görünüşünde değişiklik yaptığı sanılmıştı. Ancak, 1960'lı yıllarda İngiltere'de meydana gelen ve 10000'den fazla kanatlı hayvanın ölümüyle sonuçlanan epidemiden sonra daha çok bir zehirlenme nedeni olarak dikkati çekmiştir (1,14). Çeşitli besin maddelerinde üreyen küflerden kaynaklanan 100'den fazla (7) mikotoksin arasında aflatoksinler önem bakımından ilk sırayı alırlar. Aflatoksin terimi *As. flavus* ve çeşitli toksijenik *Aspergillus* suşları ile bazı *Penisilyum* ve *Rhizopus* suşları tarafından sentezlenen ve Aflatoksin B_1 , B_2 , G_1 ve G_2 olmak üzere dört ana bileşiği karşılar (2, 8,9,17,28,29,31,61). Günümüze kadar bu ana bileşiklerle birlikte, Aflatoksin M_1 ve M_2 'nin de bulunduğu, toplam 17 türevi izole edilmiştir (25,35,67).

Aflatoksinler uzun dalga UV ışığı altında yoğun derecede mavimsiyem yeşil floresans yayarlar; bu özellikleri kağıt ve ince tabaka kromatografisinde tanınma ve miktarlarının hesaplanmasının temelini teşkil eder (67). Aflatoksinler ısıya son derece dayanıklıdırlar. Tümüyle parçalanmaları için 300°C yada daha yüksek ısı derecelerine gerek vardır (22). Hekzan, petrol eteri gibi yağ çözücülerinin dışındaki organik çözücülerde iyi çözünürler; sudaki çözünürlükleri azadır (42,57,67). Kuvvetli alkali ve oksitleyici maddeler karşısında dönüşümsüz olarak değişirler (57).

Oral yolla verilen toksinler sindirim kanalından çabuk emilir (46). Vücuda giren toksinin yaklaşık % 10'u vücutta alıkonulurken (37), sadece % 4.5'inin kromatografik yöntemlerle tayini yapılabilmektedir (4). Bunun da % 85'i ilk 24 saat içinde süt ve idrarla,

çıkarılır. Toksin verilmesi durdurulduktan 3-6 gün sonra sütte, 6-9 gün sonra da idrar ve gaitada toksin bulunmamaktadır.

Aflatoksinlerin metabolizmaları geniş şekilde araştırılmış ama hala aydınlatılmamış yönleri de mevcuttur. Bilinmektedir ki, aflatoksinlerin kendileri doğrudan toksik etkili değildirler; vücutta uğradıkları metabolik değişiklik sonucu meydana gelen türevleri kanalı ile toksik etkilerini oluşturmaktadırlar (12,24,38,41,43). Bu türevlerden en önemlisi AFB₁ -2,3- epoxid'dir. Bu, in vivo, AFB₁ ve AFB₂'nin nükleik asitlere bağlı türevlerinin şekillenmesinde son büyük maddeler (55). AFB₂'nin vücutta AFB₁'e çevrildikten sonra etkin olduğu gösterilmiştir (64).

Aflatoksinlerin laboratuvar ve evcil hayvanlar üzerine toksik etkileri hayvanın cinsine, ırkına, yaşına, yemdeli toksin düzeyine, toksine maruz kalma süresine ve cinsiyete bağlı olarak akut, subakut, kronik ve karsinojenik olarak ortaya çıkar (13,27,30, 32). Evcil hayvanların çoğunda zehirlenme oluşturan besinlerdeki aflatoksin düzeyleri 10-100 p.p.m. ve daha aşağıdır (66). Genellikle, besinlerde 0.2 p.p.m.'e kadar bulunan aflatoksin miktarları hayvanlarda zararlı değildir (19). Türklerin çoğunluğunda AFB₁'in LD₅₀, değerleri 0.5-10 mg./kg. arasındadır (63). Aflatoksinlere en fazla duyarlılık gösteren hayvanlar günlük ördekler (61) ve alabalıklar (66), en dayanıklı olanlar ise fare (63) ve koyundur (31); ama tümüyle dayanıklı türler bilinmemektedir (24,45,66).

Aflatoksinlerle akut ve subakut zehirlenmede, hayvanlarda başlıca karaciğer hasarı görülür (66). Karaciğerlerde yaygın sentri-lobuler nekroz ve yağ birikimi ile mukoz membranların sarılığı ve yaygın kanamalar dikkati çeker (40). Kronik zehirlenmede, karaciğer sirozu ve kaslarda sarılık belirgindir. Safra kanalı hiperplazisi ve periportal fibroz gelişir. Uzun süre düşük düzeyde alınan aflatoksinler hayvanlarda hepatom, hepatosellüler karsinom ve kolangio-karsinoma yol açar (40). Ayrıca, böbrek tümörlerine (21), kolonik müsinöz adenokarsinom ve malign neurofibrosarkoma (39) neden olurlar.

Hayvanlarda gözlenen aflatoksikoz belirtilerini genel olarak şöyle sıralayabiliriz: Gelişme hızında azalma, yemin değerlendirilmesinde düşme, mortalite artışı ile yukarıda belirtildiği gibi kanser oluşumu. Ayrıca kanın pıhtılaşma ve böbrek fonksiyonunda bozulma, immün cevabın değişmesi ve strese uyum yeteneğinde azalma meydana gelir (26,33,44). Süt hayvanlarında süütün tümünden kesilmesi bile söz konusudur (26).

Aflatoksinler bilinen en güçlü karaciğer karsinojenidirler. Aralarında maymunların da yer aldığı bir çok hayvanda kanser yaparlar. Öyleki, 0.015 p.p.m.'e kadar düşük aflatoksin düzeylerinin ratta % 100 oranında karaciğer kanseri meydana getirdiği bildirilmiştir (62). Ve hatta 0.001 p.p.m.'gibi son derece düşük miktarları bile karaciğerde tümör gelişmesine yol açmaktadır (65).

Aflatoksikoz seyri süresince serum alkali fosfataz (3), laktik dehidrojenaz, SGOT, SGPT (35) ve ornitin karbomil transferaz (34) aktivitesi artar. Serum ve karaciğerin vitamin -A içeriği azalır; karaciğer bu vitamenden tümüyle yoksun kalabilir (3).

Aflatoksinle kirlenmiş besin maddelerinin tüketimi insan sağlığı yönünden de ciddi sakıncalar yaratır. Gerçekten, böyle besinleri tüketme durumundaki toplumlarda primer karaciğer kanseri ile aflatoksinler arasında yakın bir ilişkinin bulunduğu belirlenmiştir (63). Özellikle, diğer besin maddelerini bulamadıkları için fazla miktarda yer fıstığı gibi yağlı taneleri tüketen toplumlarda primer karaciğer kanserinin de fazla olması bu düşünceye dikkati çeker (25). Ugandanın Karamoje bölgesinde halkın günde besinleriyle, maymunlar için hepatotoksik düzey olarak bilinen, 0.02-2.0 mg. aflatoksin aldıkları belirtilmektedir (60).

Ülkemizde tarımsal üretim büyük ölçüde doğal koşulların etkisi altındadır. O nedenle, tarlada yada depolanmış tahıllar ile karma hayvan yemleri büyük ölçüde küflenme riskiyle yüz yüzedir. Diğer yandan, karma yem hazırlama teknikleri, nakletme ve depolama koşulları da yeterli değildir. Belirtilen bu nedenlerle, karma yem ve yem ilkel maddelerinin toksijenik mantarlarla ve konumuz olan aflatoksinlerle kontamine olmaları her zaman olasıdır. Bu çalışmanın amacı, ülkemizin çeşitli yerlerinden sağlanan süt ineği yemi ile çiğ süt örneklerinde aflatoksin kalıntılarını araştırmak ve ortaya çıkacak sonuçlara göre sorunun çözümü için önerilerde bulunmaktır.

Materyal ve Metot

Araştırma materyali: Araştırmada 106 süt ineği yemi ve 38 çiğ süt örneği aflatoksin kalıntıları yönünden analiz edildi. Elde edilen numünelerin analizi aynı gün gerçekleştirildi.

Kimyasal maddeler:

Çözücüler: Aseton, kloroform, hekzan, metanol, asetonitril, benzol ve asetik asit.

- Sodyum klörür (Merck, Art. 6400) çözeltisi (% 5'lik).
- Doymuş sodyum klörür çözeltisi.
- Kurşun asetat (Panreac) çözeltisi (% 20'lik): AOAC'ye (6) göre hazırlandı.
- Sülfirik asit (Merck) çözeltisi (% 25'lik).
- Trifluoroasetikasit (Merck).
- Diatomaceaus carth-Hyflo super cel.
- Susuz sodyum sulfat (Merck, Art. 6649).

Aflatoksin standartları :

AFB₁ ve AFG₂ standartları Applied Science Laboratories Inc.' dan; AFB₂ ve AFG₂ standartları İngiltereden sağlandı. AFM₁ standardı Sigma Chemical Company'den temin edildi. Aflatoksin standard çözeltileri AOAC'de (6) belirtilen şekilde hazırlandı; AFB₁ ve AFG₁'in, ayrı ayrı, benzol: asetonitril'de (98:2) 0.5 mikrogram/ml, lik; AFB₂ ve AFG₂'nin aynı çözücü sistemde 0.1 mikrogram/ml'lik çözeltileri hazırlandı. Ayrıca, bu dört ana bileşikten ilk ikisini 0.5 mikrogram/ml; ve sonkileri 0.1 mikrogram/ml oranında içeren bir karışım çözeltisi de hazırlandı. AFM₁'in kloroformdaki 0.5 mikrogram/ml'lik çözeltisi kullanıldı.

Alet ve malzemeler :

- Süzgeç kağıdı (Café Schiecher Shull 2043a).
- *Konik tüb.*
- Karıştırıcı (Virtis 23).
- Silica gel-G (İKT için, Merck, Art. 7731).
- Rotatif evaporatör, Buchi.
- İTK aygıtı ve ekleri (Desega).
- Azot tübü, sıcak su banyosu ve su trompu sistemi.
- Desikatör, atomizör, lastik puvar, etüv ve saç kurutma makinesi.
- Mikropipet (1,2,5 ve 10 mikrolitrelik).
- UV lambası (16 watt, uzun ve kısa dalga, Pleuger).
- Ayırma hunisi (250 ml'lik).

- Huni (5 ve 8.5 cm. çaplı).
- Erkenmayer (100 ve 250 ml'lik).
- Beherglas (200 ve 400 ml'lik).
- Balon joje (10 ml'lik).
- Silindir (50, 100 ve 150 ml'lik).
- Pipet (1,5 ve 10 ml'lik).

Yöntem :

Bu amaçla, MERSRIPOUR ve NESHEIM'in (36) süt ve idrarda AFM₁ tayini için bildirdikleri yöntemin aflatoksinlerin ekstraksiyonu ve ekstraktın kirliliklerden arıtılması kademeleri ile AOAC'de (6) bildirilen İTK yöntemi kullanıldı. Yöntemle elde edilen bulguların ayrıca sülfirik asit ve TFA ile doğrulamaları yapıldı (47, 58). İTK plakalarının developmanında, AOAC'de (6) çeşitli developman sistemleri arasından seçilen, STOLOFF ve arkadaşlarınca da (51) kullanılan benzol: metanol: asetik asit (90:5:5) developman sistemi, benzol: metanol: asetik asit (90:8:2) şeklinde değiştirilerek kullanıldı.

Aflatoksinlerin ekstraksiyonu ve Ekstraktın arıtılması :

Yem : Değirmende çekilerek öğütülmüş yemden 25 g. alındı. Üzerine 100 ml ekstraksiyon solventi (aseton: su/85: 15) ve 5g. diatome toprağı katıldı. 3 dakika yüksek hızla karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım 200 ml'lik bir behere süzüldü; bunun 50 ml'si 400 ml'lik diğer bir behere aktarıldı. Üzerine 5 ml % 20 lik kurşun asetat çözeltisi ve 50 ml distike su katıldı. Bagetle iyice karıştırıldı. Çökmesi için 5 dakika bırakıldı. Bu sürenin sonunda, ortamda kalması muhtemelen fazla kurşun asetatın giderilmesi için 2.5 ml doymuş sodyum klörür çözeltisi katıldı; iyice karıştırıldı. 2.5 g. diatome toprağı katılarak tekrar karıştırıldı. Karışım süzgeç kağıdından süzülerek 250 ml'lik bir ayırma hunisine aktarıldı. Filtratın yağı 25 ml hekzanla çalkalanarak giderildi; üstteki hekzan kısmı atıldı. Kalan sulu aseton kısmına 25 ml % 5'lik tuz çözeltisinden katıldı. İki defa 25 ml kloroformla çalkalanarak aflatoksinler kloroform fazına alındı. Kloroform ekstraktı 50 ml % 5'lik tuz çözeltisi ile yıkandı ve 20 g. susuz sodyum sulfat içeren filtre kağıdından uçurma balonuna süzüldü. Süzgeç kağıdı 10 ml kloroformla yıkandı. Kloroform rotovaporda 2-3 ml kalana kadar uçuruldu. Kalıntı konik tübe aktarıldı. Uçurma balonu

üç defa 1 ml kloroformla yıkanarak yıkantılar aynı tübe ilave edildi. Tüpteki kloroform ekstraktı sıcak su banyosunda (40°C'ye ayarlı) ve azot gazı akımı altında kuruyana kadar uçuruldu. Kalıntı İTK'ye uygulama için saklandı.

Süt: 50 ml süt numünesi üzerine 150 ml aseton ve 5g. diatome toprağı katıldı. Üç dakika yüksek hızla karıştırıcıda karıştırıldı. Sonra süzüldü. Filtratın 100 ml'si 400 ml'lik bir behere alındı. Üzerine 5 ml % 20'lik kurşun asetat çözeltisi ve 50 ml distile su katıldı. Bagetle iyice karıştırıldı. Bundan sonra aynen yemdeki işlem gibi hareket edilerek kirliliklerden arıtma ve aflatoksinlerin ayrılması tamamlandı.

İnce Tabaka Kromatografisi:

a) *Plakaların hazırlanması*: Yayma tablasına yerleştirilen ve iyice temizlenmiş 20x20 cm'lik cam plakalar 0.25 mm kalınlığında 30g. silika jel-G ve 60 ml distile su ile hazırlanan jelle kaplandı. Plakalar 30 dakika kadar bırakıldıktan sonra 110°C'de 1 saat süre ile etüvde kurutuldu. Aktiv plakalar desikatöründe saklandı.

b) *İlk aşama İTK*: Konik tüpteki kalıntı AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂'nin analizi için 0.1 ml benzol: asetonitril'de (98: 2); AFM₁'in analizi için aynı miktar kloroformda çözdürüldü. Plakaya 2x10 mikrolitre numune lekesi uygulandı. Kalan kısım doğrulama ve yarı-nicel analiz için saklandı. Aynı plakaya 2,5 ve 10 mikrolitre AFB₁ standardı ve 10 mikrolitrelik numüne lekelerinden birisi üzerine 5 mikrolitre aflatoksin standartları karışımı internal standard olarak ve aynı miktar ayrıca eksternal standard olarak lekелendi. Sütte yukarıda uygulanan numüne miktarına ilaveten 20 mikrolitre'lik bir leke de uygulandı.

Plaka develope edildi. Uzun dalga UV ışığı altında, mavi-yeşil floresans lekelerin varlığı yönünden gözle incelendi. Bu sistemde AFB₁, B₂, G₁ ve G₁'nin Rf değerleri sırası ile 0.25, 0.23, 0.18 ve 0.15; AFM₁'in Rf değeri ise 0.20 olarak bulundu. Standardlarınkine çok yakın yada onlarınkine eşit Rf değerlerdeki floresan lekeler ve benzeri görünüm belirlendi. Bunlardan sonra plakaya % 25'lik sülfirik asit çözeltisi püskürtüldü (47). Bu uygulamadan sonra aflatoksinlerin veya benzeri floresans veren lekelerin, uzun dalga UV ışığı altında, mavi-yeşilden sarı renge dönüp dönmedikleri araştırıldı. Testten sadece aflatoksinlerin yokluğunun doğrulanmasında yararlandı. Sarıya dönmeyen ve mavi-yeşil kalan lekelerin kesinlikle aflatoksin olma-

dıklarına karar verildi. Aflatoksinlerden başka maddelerde sülfirik asitle reaksiyona girerek sarı lekeler oluşturabilirler (50). Bu uygulamadan sonra bir lekenin sarıya dönmesi, onun çok büyük bir olasılıkla aflatoksin olduğunu gösterir. Bu nedenle, ilave bir doğrulama testi olarak, aflatoksin varlığının kesinlikle gösterilmesi amacı ile sarı floresans veren lekelerin temsil ettiği pozitif sonuçlu numunelerde triflorasetik asit uygulaması esasına dayanan yöntemlerden (47,58) yararlanıldı.

c) *Yarı-nicel hesaplama*: İlk aşama İTK ile pozitif olarak kabul edilen ve doğrulama yöntemleri ile aflatoksin varlığı teyid edilen numüne ekstraktları ve rekoveri denemelerinde yapıldı. Bu amaçla, İTK plakasına numüne ekstraktından 2,4,6,8 ve 10 mikrolitre ve ilk aşama İTK'de gözlemlenen, doğrulama testleri ile teyidi yapılan aflatoksin standardından (veya standardlarından) 1,2,3,4, ve 5 mikrolitre uygulandı. Aynı plakaya aflatoksin standartları karışımından 5 mikrolitre ayrı bir leke halinde lekелendi; 6 mikrolitrelik numüne ekstraktı lekelerinden birisi üzerine 5 mikrolitrelik aflatoksin standartları karışımı internal standard olarak uygulandı. Bundan sonra aynı ilk aşama İTK'deki işlemler izlendi. Kromatogramın değerlendirilmesi aşağıdaki gibi yapıldı:

Uzun dalga UV ışığı altında İTK plakası incelendiğinde, karışım halindeki aflatoksin standartları birbirinden belirgin şekilde ayrılmış dört leke halinde görüldü. Internal standard olarak kullanılan aflatoksinlerin Rf değerlerinin standartlarınkine çok yakın yada aynı olduğu belirlendi. Internal standard içeren bu numune lekesi ile numuneye ait leke karşılaştırıldığında, numuneden aflatoksin olarak nitelenen floresans lekelerin standartların oluşturduğu renklere benzediği ve Rf değerlerinin standard Rf değeri ile aynı olduğu saptandı. Standard ile numüne lekесinin üst üste çakışmasında her iki lekenin ayrı ayrı oluşturdukları lekelerden daha şiddetli floresans yaydığı belirlendi.

Her hangi bir numünede kalıntı halindeki aflatoksin lekесinin (örğ. AFB₁) leke büyüklüğü ve floresans şiddeti standardinki ile gözle karşılaştırılarak, yarı-nicel olarak aşağıdaki formüle göre p.p.b. düzeyinde hesaplandı.

$$\text{mikrogram/kg. veya L} = \frac{S \times Y \times V}{X \times W}$$

Burada:

S: Bilinmeyene eşit AFB₁ standardı, mikrolitre.

- Y: AFB₁ standardı yoğunluğu, mikrogram/ ml.
 V: Numüne ekstraktının son sulandırması, mikrolitre.
 X: S'ye eşit floresan leke veren numüne ekstraktı, mikrolitre.
 W: İTK plakasına uygulanmak üzere hazırlanan son ekstraktın temsil ettiği numüne miktarı, g. (Çalışmada 0.1 lik son sulandırma 12.5 g. yem, 25 ml süt karşılığıdır).

Sonuçlar

Analizi yapılan 106 süt ineği yemi ve 38 süt örneğinden elde edilen sonuçlara göre, 21 yem numunesinde ve 2 çiğ süt numunesinde aflatoksin kalıntıları bulundu. Süt ineği yemlerinde total aflatoksin bulunma oranı % 19.6 ve çiğ sütte AFM₁'in bulunma oranı da % 5.7 olarak belirlendi.

Aflatoksin kalıntısı satanan 21 yem numunesindeki total aflatoksin kalıntı düzeyinin 0.0125 p.p.m. (0.0125 mg./ kg.) olduğu anlaşıldı. Aflatoksin kalıntısı saptanan bu numünelerin tamamında AFB₁'e, 7'sinde AFG₁'e, 2'sinde AFB₂'ye ve 1 numünede de AFG₂'ye rastlandı.

Aflatoksin kalıntısı bulunan tüm numünelerde aflatoksin çeşitlerinin ortalama yoğunlukları şöyledir: AFB₁-0.008 p.p.m., AFB₂-0.003 p.p.m., AFG₁-0.0121 p.p.m. AFG₂-0.004 p.p.m. ve AFM₁-0.0004 p.p.m.

Yöntemin duyarlılık limiti ve rekoveri (geriye kurtarma) oranını bulmak amacı ile yem ve süt numünelerine değişik aflatoksin miktarları katılarak yapılan analizlerde, yöntemin yemde duyarlılık limitinin 2 mikrogram/ kg., rekoveri oranının % 85.2; çiğ sütte duyarlılık limitinin 0.2 mikrogram/ L., rekoveri oranının da % 85.6 olduğu belirlendi.

Tartışma

Ülkemizde tarımsal üretim büyük ölçüde doğal koşulların tesiri altındadır. Bu yüzden sıklıkla kuraklık ve pestlerin saldırısı ile karşı karşıya kalınır. Diğer yandan, tarımsal teknikler ve depolama koşulları da yeterli değildir. Böylece, gerek tarım ürünleri ve gerekse bunlardan hazırlanan hayvansal karma hazır yemler büyük ölçüde küflenme riskiyle yüz yüzedirler. Nitekim *Demirer ve arkadaşlarınınca* piyasadan sağlanan karma yem ve yem ilkel maddelerinde yapılan bir çalışmada (18), küf bulaşmasının önemli olduğu belirtilmiştir.

Çalışmada analiz edilen 106 süt ineği yemi numunesinden 21' inde aflatoksin kalıntılarına rastlandığı halde, *Demirer ve arkadaşları* (17), 92 yem ve yem ilkel maddesinden sadece birisinde; *Atlı* (10) 72 buğday numunesinden gene sadece birinde son derece düşük düzeylerde aflatoksin bulduklarını bildirmişlerdir. Kürsümüzde yapılan bir çalışmadan elde edilen veriler, karma yem ve yem ilkel maddelerinin bu toksinlerle yüksek düzeyde ve yaygın biçimde kirli olduklarını ortaya koymuştur (56). Ülkemizde, karma yemlerde aflatoksin kalıntılarına ilişkin son derece sınırlı literatür bilgi mevcuttur. Bu nedenle, bulunan sonuçların sağlıklı biçimde karşılaştırılmasını yapmak mümkün değildir. Ancak, şunu söyleyebilirizki ülke genelini temsil edebilecek çeşitte ve sayıda olan 106 yem numunesinin analizinden elde edilen sonuçlarla, yukarıda da belirtildiği gibi bu konuda yapılan sadece sınırlı sayıdaki çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında pek uyum olmadığı görülmektedir. Bunun başlıca analiz için örnekleme ile analizi yapılan yem ve yem ilkel maddesi çeşidinden ve analizlerin yapıldığı mevsimden kaynaklandığı sanılmaktadır.

Dünyanın bir çok ülkesinde yemlerde bulunan aflatoksin kalıntıları yönünden yapılan çalışmalarda, yem ve yem ilkel maddelerinin aflatoksinlerle yüksek düzeyde kirlendikleri ortaya konulmuştur (32, 49,52).

Genellikle besinlerde 0.2 p.p.m.'e kadar bulunan aflatoksin kalıntıları hayvanlarda zararsızdır. Ancak, 0.02 p.p.m.'den yukarı düzeylerde aflatoksin içeren yemleri yiyen süt hayvanlarının sütleri ile aflatoksin çıkaracakları unutulmamalıdır (11). 0.14-0.69 p.p.m. düzeyinde AFB₁ ile kirli yer fıstıklarının farklı miktarlarını kapsayan yem ile 111-140 gün süreyle beslenen sığırlarda zehirlenme görülmediği belirtilmiştir (5). 0.1-0.3 p.p.m. düzeyinde toksin içeren yemin kastre tosunlarda etkili olmadığı, 0.7-1.0 p.p.m. aflatoksin kasayan yemlerle beslenen aynı tür hayvanlarda besini değerlendirme ve ağırlık kazancının azaldığı görülmüştür (23).

Yukarıdaki literatür verileriyle karşılaştırıldığında, süt ineği yeminde belirlenen 0.0125 p.p.m.'lik aflatoksin düzeyinin hayvanlarda zehirlenme yapmayacağı ve 6 yem numunesinin sütte toksin oluşturabileceği kasma varıldı. Diğer yandan, bulunan bu düzey Amerika Birleşik Devletleri'nde F.D.A. örgütünün yemlerde bulunmasına izin verdiği 0.02 p.p.m.'lik düzeyden de çok düşüktür (19,59).

Aflatoksinle bulaşık yemi yiyen süt hayvanları yemle aldıkları AFB₁ miktarı ile orantılı olarak sütleri ile AFM₁ çıkarırlar (2,4).

Günde 25 litre süt veren bir ineğin 0.02 mg/kg. düzeyinde aflatoksinle kirlenmiş yemle beslendiğinde sütü ile 0.02-0.2 mikrogram/L. yoğunluğunda aflatoksin atabileceği hesaplanmıştır (20).

Süt ve ürünlerinde AFM kalıntılarının varlığı ile ilgili çok sayıda araştırma mevcuttur. *Kiermeier ve arkadaşları* (32) 419 çiğ süt numunesinin 79'unda 0.05-0.54 mikrogram/L.; *Purchase ve Vorster* (48) 21 ticari süt numunesinden 5'inde 0.16 mikrogram/L.; *Suzangar ve Barnett* (54) 67 süt numunesinden 36'sında 50-250 mikrogram/L. düzeylerinde AFM₁ ve AFM₂ bulmuşlardır.

Yukarıdaki literatür verilerin ışığında, AFM yönünden analizi yapılan 38 çiğ süt numunesinin 2'sinde 0.4 mikrogram/L. yoğunluğunda AFM₁ bulunduğu dikkate alınrsa, bulunan bu AFM₁ miktarı ve rastlantı oranının çok düşük olduğu kolayca ortaya çıkar. Bu da ülkemizde üretilen süt ve ürünlerinin AFM₁ ile kirlenme olasılığının çok zayıf olduğu yönündeki kanımızı güçlendirmektedir. *Demirer* (16) ve *Çoksöyler ve Köşker* (15) tarafından yapılan çalışmalar da bu savımızı desteklemektedir.

Süt ve ürünlerinin AFM₁ ile kirlenmesi halk sağlığı yönünden önemli bir tehlike yaratır. Süt ve ürünleri bebek besininin önemli bir bölümünü oluşturduğundan bu durum özellikle önem taşır (53). Aflatoksinle bulaşık yem yiyen hayvanlar aracılığı ile et, süt ve yumurta aflatoksin yada türevleri ile dolaylı şekilde bulaştırılabilir ve bu besinler insanlar için bir mikrotoksin kaynağı oluştururlar (67).

Sonuç olarak, analiz edilen numünelerde belirlenen aflatoksin düzeyleri hayvanlarda akut zehirlenmeye yol açacak boyutta görülmemiştir. Belirlenen bu kirlilik düzeyleri pek çok ülkede bu tür besinlerde bulunmasına izin verilen yoğunlukların çok altındadır. Ancak, ülkemizde hasad, depolama ve yem hazırlama tekniklerinin uygunsuzluğu nedeni ile üretilen yemlerin yüksek düzeyde küflenme riskiyle yüz yüze olduğu, bunun da uzun sürede hayvancılık endüstrisinde olumsuz etkiler yapabileceği kanısına varıldı.

Literatür

- 1- **Allcroft, R., et al** (1961): *A toxic factor in Brazilian Groundnut meal*. Vet.Rec., 73, 428-429.
- 2- **Allcroft, R. and 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.
- 3- **Allcroft, R. and Lewis, G.** (1963): *Groundnut toxicity in cattle: Experimental poisoning of calves and a report of clinical effects in older cattle*. Vet. Rec., 75, 487-493.

- 4- **Allcroft, R., Roberts, B.A. and L'Loyd, M.K.** (1968): *Excretion of aflatoxin in lactating cow.* *Fd. Cosmet.Toxicol.*, 6, 619-625.
- 5- **Anon** (1964): *A summary of recent pig and cattle experiment with toxic groundnut meal.* *Vet. Rec.*, 76, 498-500.
- 6- **AOAC** (1975): *Natural poisons AOAC, Official Methods of Analysis 12th edition.* Washington.
- 7- **Arafa, A.S., et al** (1979): *Review of aflatoxicosis in animal production.* *Feedstuffs*, 51 (38), 36-38, 52.
- 8- **Arda, M.** (1975): *Mikotoksiner ve mikotoksikoz.* *Vet.Hek.Der.Derg.*, 45, (3): 5-18.
- 9- **Arda, M.** (1980): *Mikoloji.* A.Ü.Vet.Fak. yayınları: 366, Ders kitabı 264, Ankara, 260-272.
- 10- **Athi, A. ve Köşker, Ö.** (1980): *Buğday, un ve ekmekte aflatoksin oluşumu ve stabilitesi üzerine araştırmalar.* İhtisas tez özetleri, 1, 196-311. Ankara Üniversitesi Basımevi-Ankara.
- 11- **Brown, J.F.** (1977): *Regulatory consideration of aflatoxin in regard to animal feed safety.* *Proceedings of the annual of the U.S.Animal Health Ass'n.*, 81, 211-214.
- 12- **Campbell, T.C. and Stolof, L.** (1974): *Implication of mycotoxins for human health.* *J.Agr.Food chem.*, 22 (6), 1006-1014.
- 13- **Carnaghan, R.B.A., Hartley, R.D. and O'Kelly, J.** (1963): *Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins.* *Nature*, 200, 1101.
- 14- **Clegg, F.G. and Bryson, H.** (1962): *An outbreak of poisoning in store cattle attributed to Brazilian groundnut meal.* *Vet. Rec.*, 74, 992-994.
- 15- **Çoksöyler, N. ve Köşker, Ö.** (1980): *Süt ve mamüllerinde aflatoksin oluşumu üzerine araştırmalar.* İhtisas tez özetleri, 1, 436-456. Ankara Üniversitesi Basımevi-Ankara.
- 16- **Demirer, M.A.** (1973): *Süt ve mamüllerinde aflatoksin M₁ ve B₁ aranması üzerine araştırmalar.* A.Ü.Vet.Fak.Derg., XX (2-3): 421-443.
- 17- **Demirer, M.A. ve ark.** (1979): *Piyasada satılmakta olan bazı karma yemlerde aflatoksin B₂ aranması.* A.Ü.Vet.Fak.Derg., XXVI (1-2): 169-184.
- 18- **Demirer, M.A. ve ark.** (1979): *Piyasada satılan bazı karma yemlerin ve yem hammaddelerinin mikroflorasının belirlenmesi ve bunlarda Aspergillus suşlarının aflatoksin yapabilme yeteneklerinin araştırılması.* A.Ü.Vet.Fak.Derg., XXVI (3-4): 64-82.
- 19- **Edds, G.T., Meyerholz, G.W. and Abbitt, B.** (1978): *Aflatoxin and other mold toxins in livestock and poultry feed.* In proceedings eighty-second annual meeting to the U.S. Annual Health Ass'n. Buffalo, N.Y. Oct.29-31, Nov. 1-3, 1978. Richmond, Virginia 23 228, USA, US Animal Health Association, 221-224.
- 20- **Egmond, H.P.Van et al.** (1977): *The effects of proceeding on the aflatoxin M₁ content of milk and milk product.* *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 54 (3-4): 381-390.
- 21- **Epstein, S.M., Bartus, B. and Farber, E.** (1969): *Renal epithelial neoplasms induced in male Wistar rats by oral aflatoxin B₁.* *Can.Res.*, 29, 1045-1050.
- 22- **Fishbach, H. and Campbell, A.D.** (1968): *Note on decontamination of the aflatoxins.* *Journal of the AOAC*, 48(1), 28.

- 23- **Garret, W.M., Heitman, H.Jr., and Booth, A.N.** (1968): *Aflatoxin toxicity in beef cattle*. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 127, 188-190.
- 24- **Gurtoo, H.L. and Motycka, L.** (1976): *Effects of sex difference on the in vitro and in vivo metabolism of aflatoxin B₁ by the rat*. Can.Res., 36 (12), 4663-4671.
- 25- **Güray, Ö. ve Vural, N.** (1968): *Mikotoksinlerle meydana gelen besin zehirlenmeleri mü-nasebeti ile aflatoksinler üzerine bir araştırma*. A.Ü.Tıp Fak.Mec., XXI (4): 1030-1044.
- 26- **Hamilton, P.M.** (1976): *Effects of aflatoxin on animals and the interrelationship with nutr-ition*. Feedstuffs, 48 (18): 22-23.
- 27- **Hatch, R.C., et al.** (1979): *Experimental induced acut aflatoxicosis in goats treated with ethylmaleat, glutathion precursors or thiosulfate*. Am.J.Vet.Res., 40 (4): 505-511.
- 28- **Hesseltine, C.W., et al.** (1966): *Aflatoxin formation by As. flavus*. Bact. Rev., 30, 795-805.
- 29- **Hodges, F.A., et al.** (1964): *Mycotoxins: Aflatoxin isolated from Penicillium puberulum*. Science, 145, 1439.
- 30- **Jacobson, W.C. and Wiseman, H.C.** (1974): *The transmission of aflatoxin B₁ into eggs*. Poultry Sci., 53, 1743-1745.
- 31- **Keyl, A.C.** (1978): *Mycotoxins in cattle*. In mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Vol. 2 (Ed. by T.D. Wyllie and L.G.Morehous), New-York, USA-Merkel Dekker, 2-28.
- 32- **Kiermeier, F. et al** (1977): *Presence and content of aflatoxin M₁ in milk supplied to a dairy*. Z.Lebensm. Unters. Forsch., 163 (3): 171-174.
- 33- **Lynch, G.P., et al.** (1970): *Response of dairy calves to aflatoxin-contaminated fed*. J.Dairy Sci., 53, 67-71.
- 34- **Lynch, G.P. et al.** (1971): *Response of dairy calves to oral doses of aflatoxin*. J. Dairy Sci., 54 (11): 1688-1698.
- 35- **Lynch, G.P.** (1972): *Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle*. J. Dairy Sci., 55 (9): 1243-1255.
- 36- **Messripour, M. and Nesheim, S.** (1977): *A column detection method for aflatoxin M₁ in milk and urine*. Archives de L'Institut Pasteur de Tunis, 54 (3-4): 363-371.-
- 37- **Murthy, T.R.K.et al.** (1975): *Aflatoxin residues in tissues of growing swine: Effect of seperate and mixed feeding on protein and protein-free portions of the diet*. Journal of the Anim. Sci., 41 (5): 1339-1347.
- 38- **Mücke, W. und Schulze, H.** (1981): *Höchstmengenregelungen für Mycotoxine in Lebens-mitteln*. In JÜRGEN REISS (1981): *Mycotoxine in Lebensmitteln*, pp. 489-509. Gistav Fischer Verlag.
- 39- **Newberne, P.M. and Wogan, G.N.** (1968): *Sequential morphological changes in aflato-xin B₁ carcinogenesis in the rat*. Can.Res., 28 (4): 770-781.
- 40- **Newberne, P.M.** (1973): *Chronic aflatoxicosis*. J.A.V.M.A., 163, (11): 1262-1267.
- 41- **Patterson, D.S.P. and Roberts, B.A.** (1972): *Aflatoxin metabolism in duct liver homo-genesates the relative importance of reversible cyclopentanone reduction and hemiacetal formation*. Fd. Cosmet Toxicol., 10, 501-512.

- 42- **Peterson, R. and Ciegler, A.** (1967): *Note on a water-based aflatoxin standard.* *Journal of the AOAC*, 50 (5): 1201-1202.
- 43- **Phillips, D.L., Yourtee, D.M. and Searles, S.** (1976): *Presence of aflatoxin B₁ in human liver in the United States.* *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 36, 403-406.
- 44- **Pier, A.C.** (1973): *An overview of the mycotoxins of domestic animals.* *J.A.V.M.A.*, 163 (11), 1259-1261.
- 45- **Pier, A.C.** (1976): *Biological effects and diagnostic problems of mycotoxicoses in poultry.* In proceeding of 25th western poultry disease conference and 10 th poultry health symposium, March 8-11, Orcines, California, USA.
- 46- **Polan, C.E., Hayes, J.R. and Campbell, J.R.** (1974): *Consumption and fate aflatoxin B₁ by lactating cows.* *J.Agr. Food Chem.*, 22, (4): 635-638.
- 47- **Przybylski, W.** (1975): *Formation of aflatoxin derivation on TLC plates.* *Journal of the AOAC*, 58 (1): 163-164.
- 48- **Purchase, I.F.H. and Vorster, L.J.** (1968): *Aflatoxin in commercial milk samples.* *S. Afr. Med. J.*, 42, 219.
- 49- **Scott, P.U.** (1978): *Mycotoxins in feeds and ingredients and thier origin.* *Journal of the Fd. Protection*, 41(5), 385-398.
- 50- **Siriwardana, M.G.** (1977): *Le probleme des artefact le dosage.* *Archives de L'Institut Pasteur de Tunis*, 54 (1-4), 405-409.
- 51- **Stoloff, L., et al.** (1971): *A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin.* *Journal of the AOAC*, 54 (1): 91-97.
- 52- **Strzelecki, E.L. and Gasiorowska, U.W.** (1974): *Aflatoxin B₁ in feedstuffs.* *Zlb. Vet. Med. B.*, 21, 395-400.
- 53- **Stubblefield, R.D., Shannon, G.M. and Shotwel, O.L.** (1973): *Aflatoxin in milk: Evaluation of methods.* *Journal of the AOAC*, 56, (5): 1106-1110.
- 54- **Suzangar, M. and Barnett, R.** (1977): *Contamination of Isfahan village milk with aflatoxin.* *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, 189, 35-39.
- 55- **Swenson, D.H., et al.** (1977): *Aflatoxin B₁-2,3-oxid as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B₁ and B₂ to rat liver DNA and ribosomal-RNA in vivo.* *Can. Res.*, 37(1): 172-181.
- 56- **Şanlı, Y., Ceylan, S. ve Kaya, S.** (1982): *Kanaltı yemlerinde ve yem ilkel maddelerinde aflatoxinler.* *A.Ü.Vet.Fak.Derg.* 29 (3-4), 473-492.
- 57- **Trager, W. and Stoloff, L.** (1967): *Possible reactions for aflatoxin detoxification.* *Journal of Agr. Food Chem.*, 15 (4): 679-681.
- 58- **Trucksess, M.W.** (1976): *Derivatization procedure for identification of aflatoxin M₁ of thin layer chromatogram.* *Journal of the AOAC*, 58, (3): 722-723.
- 59- **Wessel, J.R. and Stoloff, L.** (1973): *Regulatory surveillance for aflatoxin and other mycotoxin in feed, meat and milk.* *J.A.V.M.A.*, 163, (11): 1284-1287.
- 60- **Wilson, B.J.** (1978): *Hazards of mycotoxins to public health.* *Journal of Fd. Protec.*, 41 (5): 375-384.

- 61- **Wogan, G.N.** (1966): *Chemical nature and biological effects of the aflatoxins*. Bac.Rev., 30 (2): 460-470.
- 62- **Wogan, G.N. and Newberne, P.M.** (1967): *Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat*. Can.Res., 27 (12): 2370-2376.
- 63- **Wogan, G.N.** (1968): *Aflatoxin risks and control measures*. Fed.Proc., 27 (3): 932-938.
- 64- **Wogan, G.N., Edwards, G.S. and Newberne, P.M.** (1971): *Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs*. Can.Res., 31 (12): 1936-1942.
- 65- **Wogan, G.N., Paglalunga, S. and Newbenne, P.M.** (1974): *Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B₁ in rat*. Fd. Cosmet. Toxicol., 12, 681-685.
- 66- **Wogan, G.N.** (1975): *Mycotoxins*. Annual review of pharmacology, 15, 437-451.
- 67- **World Health Organization** (1979): *Environmental Health Criteria II: Mycotoxins*. Published under the joint sponsorship of thi United Nations Environment Programme and the WHO, Geneva, pp. 1-127.