

# TAVUK KARMA YEMLERİNDE AFLATOKSİN ARAŞTIRILMASI VE AFLATOKSİNİN HAYVAN BESLEMEDE ZARARLI ETKİLERİ

(A study on aflatoxin's in intensiv poultry feed and toxicity in animal feeding)

Hülya OLGUN (\*)

## GİRİŞ

Son yıllarda Dünyanın en ilgi çekici ve güncel konularından biri de aflatoksinlerdir. *Aspergillus Flavus* grubu küfler tarafından bitkisel ve hayvansal gıda maddelerinde meydana getirilen aflatoksin olarak tanımlanan kanserojen nitelikteki metabolitlerin önemi üzerinde bütün Dünya Ülkelerinde olduğu gibi memleketimizde de durulmaya başlanılmış ve bu konuda yapılan çalışmalar da giderek artmaktadır (6).

*Aspergillus Flavus* başta sıcak Ülkeler olmak üzere Afrika, Asya, Avrupa ile Kuzey ve Güney Amerika Ülkelerinde üretilen ayçiçeği, pamuk tohumu, yer fıstığı ve soya fasülyesi küspeleri ile mısır, akdarı, pirinç, hindistan cevizinde saptanmış, ancak rafine yağlarda tesbit edilememiştir (8).

*Aspergilluslar* yem bitkilerinin uzun veya kısa süreli saklanması sırasında rutubetli ve sıcak yerlerde usulüne uygun olarak depolanmaması ve elverişsiz koşullarda hasat edilmesi halinde, yapılarını bozarak, besin değerlerinin düşmesine neden olurlar. Bu durum, kuşkusuz hayvan besleme alanında büyük ekonomik kayıpların ortaya çıkmasında önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır.

Yapılan araştırma sonuçlarına göre toprağın mukotoksinlerle bulaşması bitkinin büyümesini yavaşlatmakta, hatta geriletmekte ve bu durumun doğal sonucu olarak yıllık bitkisel üretimin % 25 oranında azaldığı bildirilmektedir (5).

---

(\*) Uzman Vet. Hekim, Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü

Bitkisel üretimin bu oranda azalması halinde, halen açlık tehlikesinin söz konusu olduğu Dünyamızda insanların beslenmesine ilişkin önemli sorunlar ortaya çıkabilecektir. Diğer taraftan çeşitli gıda maddelerinde küf ve mantarların üremesi bu maddelerin görünümünü, rengini, şeklini ve lezzetini bozmaktadır.

İnsan beslenmesinde önemli yeri olan peynirlerde bu durum çok belirgin bir biçimde görülebilir. Bazı hallerde ise küf ve mantarların gıda maddelerinde üremesi sonucu, bunları yiyen insan ve hayvanlarda çeşitli zehirlenme olayları da ortaya çıkmaktadır.

İnsan ve hayvanlar tarafından küflü gıda maddelerinin tüketilmesi sonucu ortaya çıkan zehirlenme olayları, 1940 yılında Rusya'da ve 1960 yılında İngiltere'de toplu ölümlerin görülmesine değin, önemsenmemiştir (17, 29, 30).

Gerek insan gerekse hayvan beslemede bu denli sorunlara neden olan aflatoksinlerin çeşitli gıda ve yem maddelerindeki miktarlarının bilinmesi ve gerekli önlemlerin alınması büyük önem taşımaktadır. Veteriner Hekimlik sahasında mukotoksikozların teşhisinde şimdiye değin çeşitli zorluklarla karşılaşılmaktaydı. Ancak bu alanda derinlemesine yapılan araştırmalar hayvancılığa büyük yararlar sağlamıştır. Özellikle giderek gelişen tavukçuluğun büyük zararlardan kurtarılmasında mikolojik teşhise son derece önem verilmesi gerekmektedir.

Bu bakımdan araştırmamızda, Ülkemizde çeşitli fabrika ve kuruluşlar tarafından üretilen tavuk yemlerindeki aflatoksin miktarının saptanması amaç edinilmiştir.

## LİTERATÜR BİLGİSİ

Mikotoksikozlar çok eskiden beri bilindikleri halde bu konuda çalışmalar 1964 - 1965 yıllarında başlamış sonradan bu konu üzerinde çok sayıda laboratuvar çalışmaları yapılmıştır.

Aspergillus Flavus, Gungus'lar grubundan Eumycetes Ascomycetes sınıfından Plecta Scales takımının Aspergillaceae familyasına dahildir. Aspergillus cinsinin kendine özgü bazı özellikleri vardır. Bunların sporları yuvarlak veya oval olup, satırları pürüzlüdür. Renkleri açık sarı ve yeşilin çeşitli tonlarından olabilir. Saprofit olarak karbonhidrat ve proteinden zengin ortamlarda yaşarlar. Bu mantarların aflatoksin oluşturabilmesi için optimal ısının 24 - 25 °C, nemin ise % 18. 5 oranında olması gerekmektedir. Ortamdaki oksijenin % 1'e düşürülmesi, Aspergillus Flavus küf mantarlarının üremesini engeller ve dolayısıyla aflatoksin oluşumunun durmasına neden olur (9).

Kromotografik olarak yapılan çalışmalarda bu toksinin 4 komponentinin bulunduğu bildirilmektedir (38).

Bunlar ultraviyole ışınlarında mavi florasan veren  $B_1$ ,  $B_2$  ve yeşil florasan veren  $G_1$   $G_2$  dir. Bundan başka Allcroft ve Carnaghan (1 - 2) aflatoksin içeren küspeleri yiyen ineklerin sütünde 2 komponentli bir aflatoksin daha ekstrakte etmişler ve bunlara süt (milk) kelimesinin ilk harfi olan  $M_1$  ve  $M_2$  adını vermişlerdir. Aflatoksinlerin en önemli komponenti olan aflatoksin  $B_1$  in kapalı formülü  $C_{17} H_{12} O_6$  dir. Bu komponent sıcağa dayanıklı olup, erime noktası  $268 - 269^{\circ}C$  dir. Ultraviyole ışığında mavi florasan verir. Klo-roform, benzin ve suda kolaylıkla erir.

Aflatoksin  $G_1$  in kapalı formülü  $C_{17} H_{12} O_7$  , erime noktası  $245^{\circ}C$  dir. Ultraviyole ışınları karşısında sarı ve yeşil florasan verir. Bütün aflatoksinlerin 1N sodyum hidroksit ile 30 - 45 dakika, 2N hidroklorik asit ile 120 dakika içinde yıkıldığı ortaya konmuştur (38).

Mikotoksinler bazı küf grubu mantarların toksik metabolitleri olup bunların üremesi sırasında meydana gelirler . Mikotoksinler insan ve hayvanlarda akut, subakut ve kronik zehirlenmelere neden oldukları gibi aynı zamanda karsinojenik etkiye de sahip bulunmak-tadır. Mikotoksinlerin aşağıda açıklanan bazı özel çevre koşullarında oluştuğu bildiril-mektedir (40). Buna göre:

- 1 - Yemde nem oranının % 14 - 30 oranında olması.
- 2 - Genellikle % 75 ve daha yüksek nisbi hava nemliliği.
- 3 - 18 - 22 C arasında olan optimal sıcaklık (Gungusların çoğu için).
- 4 - Yemlerde katkı maddeleri (Vitaminler, oligo elementler gibi),

Küflerle bulaşmış olan yemler aşağıdaki yöntemlerden herhangi biri uygulanarak tekrar kullanılabilir hale getirilebilirler (40).

- 1 -  $150^{\circ}C$  den az olmayan bir ısıda 30 dakika veya  $100^{\circ}C$  den az olmayan bir ısıda 1 saat ısıtılma veya otoklavlanma yolu ile.
- 2 - Buhar yolu ile, örneğin patates ve pancarları buhara tutarak.
- 3 - Tahıllara toz kömürü ilâve ederek, sonra bunlar elenip ve ayıklanarak.
- 4 - Tahıllar % 3 lük hidrojen peroksit solüsyonu veya % 42 lik sülfürik asit veya % 1 lik sodyum, potasyum hidroksit solüsyonu ile yıkandıktan sonra bol su ile çal-kalanarak.
- 5 - Yemler üzerinde aflatoksin antionisti olarak kabul edilen amonyak ilâve edil-mesiyle.
- 6 - Yemler 2 - 3 dakika müddetle ultraviyole ışınlarına tabi tutularak.

Bu yöntemler dışında yemlerin küflerden arındırılmasında en etkili yöntem yem maddelerinin ve yem ürünlerinin süratle kurutulması ve kuru vaziyette depolanmasıdır.

Aflatoksin'in organizmadaki işleyiş mekanizması şu şekilde izah edilmektedir (11 - 12).

Aflatoksin ilk olarak hücre ve hücre çekirdeklerine nüfuz eder. Sonra DNA (De-soxyribonucleic asit) ile birleşir. Bu birleşme sonucu RNA (Ribonucleic asit) sentezi azalır ve m - RNA üretimi engellenir. Bu durum sonucu 5 dakika içinde protein sentezi

bloke edilir. Mitoz safhasında engellenmiş olup, mitoz safhasının engellenmesini hücrenin ölümü izler.

Memeliler, kanatlılar ve balıklar (özellikle alabalık) aflatoksin zehirlenmesine karşı hassastırlar. Koyunların aflatoksine karşı dirençleri oldukça yüksektir. En hassas olan hayvanlar ördek yavruları ve alabalıklardır. Aynı şekilde genç hayvanlar erişkinlere nazaran daha duyarlıdırlar.

Aflatoksinlerin vücuttan atılması genellikle çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Yemin yenmesinden 24 saat sonra organizmadaki aflatoksin düzeyi araştırma için uygulanan seviyenin altına düşer. Aflatoksin kelimesi *Aspergillus Flavus*'un A ve Fla harflerinin birleşmesinden oluşmuştur.

Sargalet et al. (34) 1961 yılında *Aspergillus Flavus*'un Aflatoksin salgıladığını, Allcroft ve Carnaghan (2) adındaki araştırmacılar ise 1963 yılında bu Aflatoksirin kansinojenik etkisini ortaya koymuşlardır.

Aflatoksinler kansinojenik etki yanında tümör yapıcı özelliğe de sahiptirler. Bu özelliğe karşı en hassas hayvanlar alabalıklardır. Bu balıklar, kilogramında 0.5 - 2 ppm. aflatoksin ihtiva eden yemle beslendikleri taktirde 10 aydan kısa bir süre içinde karaciğer tümörü meydana gelmektedir (40).

Aflatoksinin kansinojenik ve tümör yapıcı etkisinin saptanmasından sonra bazı ülkeler bunun gıda maddelerindeki optimum miktarlarını standartlarla tesbit etmişlerdir. FAO ve Dünya Sağlık Örgütü gıda maddelerinde bulunabilecek aflatoksin miktarını 30 ppm. olarak önermişlerdir (32). Ancak kimi ülkeler bu miktarın yüksek olduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde yer fıstığında aflatoksinin optimum miktarı 20 ppm. e indirilmiştir. Günümüzde bu sınırın 15 ppm'e indirilmesi üzerinde tartışmalar yapılmaktadır (39).

Aflatoksin komponentlerinden B<sub>1</sub> en çok toksik etkiye sahip olanıdır. Bu etkinin B<sub>2</sub> den 4 kez daha fazla olduğu ileri sürülmektedir (38).

Diğer taraftan İngiltere'de 1960 yılında aflatoksin zehirlenmeleri yavru hindilerde ölümlere neden olmuştur. Yapılan otopside hindilerde iç organlar konjesyon ve ödemli, karaciğerin büyümüş, soluk ve sert kıvamda olduğu bildirilmektedir. Bu hastalığın çıkmasına rasyonun bileşimine giren yer fıstığı küspesinde saptanan *Aspergillus Flavus*'un salgıladığı aflatoksin'in neden olduğu belirtilmiştir (7, 29).

Aflatoksin'in çeşitli hayvanlar üzerindeki toksik etkisi hayvanın türüne, yaşına, yemdeki toksinin dozuna ve toksine maruz kalma süresine bağlıdır.

Memeli hayvanlardan buzağılar, kanatlılardan ise ördek yavruları aflatoksinlere karşı en duyarlı hayvanlardır. Bir günlük ördek yavrusu için öldürücü doz (LD<sub>50</sub>) 0.5 mg/

kg dır. Köpek, tavşan, kobay ve tatlı su balıkları için ise bu doz'un 0. 5 mg/kg olduğu bildirilmektedir (30). Ayrıca toksisite hayvanın yaşına bağlı olarakta değişir. Ergin hayvanlarda aflatoksinin daha fazla miktarlara toksik etki yapmaktadır. Örneğin bir günlük fare için LD<sub>50</sub> 1 mg/kg iken, 21 günlük fare için bu miktarın 7 mg/kg olduğu belirtilmiştir.

Akut zehirlenmelerde ölüm, genellikle toksin alındıktan 72 saat sonra meydana gelmektedir. Ölümden sonra yapılan otopside yemek borusu, mide, bağırsak, iskelet kasları, dokularda subcutis'de hemoraji, bağırsak içi ve abdominal boşlukta kanlı sıvı toplanması, karaciğerde yağlanma, karaciğer hücrelerinde nekroz, safra kanallarında proliferasyon, loblarda atrofik değişimler görülmektedir (19).

Diğer taraftan, Kratzer ve arkadaşları (28), aflatoksin içeren rasyonlarla beslenen yumurta tavuklarında civciv çıkma oranının düştüğünü saptamışlardır. Bu araştırmalarda günlük rasyonlarına 2. 7 ppm. miktarında aflatoksin katılan deneme grubunda yumurta- dan civciv çıkma oranının normal rasyonla beslenenlere nazaran önemli derecede düşük olduğu bildirilmiştir.

Allcfort ve arkadaşları (3), 600 kg. canlı ağırlığındaki bir ineğe laktasyon süresince peros olarak 300 mg aflatoksin (% 44 B<sub>1</sub>, % 44 G<sub>1</sub>, % 2 B<sub>2</sub>) uyguladıkları araştırmalarında aflatoksin verilmesini izleyen 9. günde hayvanlardan alınan süt, idrar ve gübre örneklerinde aflatoksin analizi yapmışlardır. Araştırmacılar süt ve idrar örneklerinde saptanan aflatoksinin % 85'ni 48 saat içerisinde ekstrakte ettiklerini 4 gün sonunda sütte, 6. gün bitiminde ise idrar ve gübrede aflatoksin saptanamadığını bildirmişlerdir.

Frank (18), çeşitli hububat ve ürünleri, baklagiller ve kurutulmuş meyvalar üzerinde aflatoksin oluşumunu incelemiştir. Araştırmacı Aspergillus Flavus sporları ile hazırladığı bir suspansiyonla aşılayıp nemlendirdiği kuru incirleri oda sıcaklığında 6 gün inkubasyona bırakmış ve bu süre sonunda 0. 05 ppm. aflatoksin B<sub>1</sub> ve 0. 075 ppm. aflatoksin G<sub>1</sub> meydana geldiğini ortaya koymuştur. Memleketimizin önemli dış satım ürünlerinden olan incir, yer fıstığı gibi tarımsal ürünlerin aflatoksin kapsadığı gerekçesiyle alıcı ülkeler tarafından ya bloke edildiği yada geri gönderildiği bildirilmektedir (27).

Ülkemizde de aflatoksinler üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Güray ve Vural (19), 27 fındık numunesi ile yürüttüğü araştırmada biri şüpheli olmak üzere 6 numunede Aspergillus Flavus üremesi sonucu aflatoksin saptadıklarını bildirmişlerdir.

Demirer M. (13), süt ve süt mamüllerinden aflatoksin M<sub>1</sub> aranması ve identifiye edilmesi üzerinde çalışmıştır. Aynı araştırmacı (15), çeşitli tip peynirlerle yaptığı diğer bir araştırmasında toksijenik gücü araştırılan 40 küf türünün aflatoksin meydana getirmedğini ortaya koymuştur.

Denizel ve Köşker (16), İngiltere piyasalarında satılan ve Türkiye dahil birçok ülkelerden ithal edilen 37 adet fındık ve fıstık numunelerinde 127 küf izole edildiğini ve bunların büyük bir kısmının *Aspergillus* cinsine ait olduğunu saptamışlardır.

Aşkın ve arkadaşları (7), yurdumuzda üretilen kuru incir ve ezmeleler üzerinde yaptıkları bir araştırmada koşulların uygun olması halinde kuru incirlerde aflatoksin meydana gelebileceğini ortaya koymuşlardır.

Kimi araştırmacılar (23 - 24), günlük rasyonlarda yapılacak değişikliklerle aflatoksinlerin zararlı etkilerini önlenmesinin mümkün olabileceğini bildirmektedirler. Örneğin, küflenmiş yem maddelerinin ham besin değerlerinin normal yem maddelerine oranla daha düşük olduğu bildirilmektedir (23).

Bu bakımdan böyle yem maddelerinin rasyonda kullanılmasının zorunlu olduğu halde ham besin değerlerinin gözönünde bulundurulması gereğine değinilmektedir. Diğer taraftan hayvanlarda aflatoksin sorununun aydınlığa kavuşturulmasına ilişkin birçok araştırmaya tanık bulunmaktayız (14 - 25 - 26 - 35 - 36).

## MATERYAL VE METOD

Ankara ve İzmir Bölgesindeki yem fabrikalarından getirilen 10 adet tavuk yemi, 1 adet piliç büyüme yemi ve bir adet pamuk tohumu küspesi, bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Aflatoksin analizi yapılan yemlerde 8 Aralık 1978 tarihinden başlamak üzere bir hafta ara ile rastgele numune alınmış ve numunelerde aflatoksin meydana gelmesini önlemek amacıyla oda ısısında ağzı açık torbalarda saklanmıştır.

Yemlerde üreyen mantarlar (aflatoksin) yem yığınları içerisinde kümeler halinde üreme gösterdiğinden numune alma esnasında şu hususlara özen gösterilmiştir.

- 1 - Analizlerde mümkün olan en küçük numune biriminin kullanılmasına dikkat edilmiştir.
- 2 - Kontamine kısımlardan uygun bir dağılım sağlayabilmek için iyi bir karışım yapılmıştır.
- 3 - Böyle bir karışımın sağlanabilmesi için tüm numuneler 20 no.lu elekten geçebilecek şekilde öğütülmüştür.

Yemlerde aflatoksin analizi Şanlı ve arkadaşları (37), tarafından modifiye edilen, Robert ve Patterson (33) ile Horwitz et al (22), metodlarına göre aşağıdaki gibi yapılmıştır:

### Standartların Hazırlanması:

Kuru haldeki aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> yi içeren kap içerisine 98+ 2 oranında benzol + asetonitril karışımından volumetrik olarak 8 - 10 ppm. yoğunluk sağlayacak

şekilde ilâve edilir. Aflatoksin M<sub>1</sub> için kloroform kullanılır. Aflatoksinin kantitatif ağırlığı için standartın etiket miktarı dikkate alınmalıdır. Kuru haldeki standartta çözücü katıldıktan sonra karışım bir dakika özenle çalkalanır ve dilüsyon için gerekli miktar beletilmeden alınır.

Çözelti halindeki standartlarda, bunlar uygun hacimlerdeki cam kaba aktarılırlar. Gerekirse 8 - 10 ppm. dilüsyona kadar seyreltilirler. Standartlar depo çözeltiler halinde seyreltilip, yoğunlukları kontrol edildikten sonra aflatoksin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>, içten TLG uygulama çözeltisi olarak 5 ppm ve B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> için 5/1 oranındaki dilüsyonları hazırlanır. Bu çözeltilerden uygulama için gerekli kısım ayrıldıktan sonra kalan miktarlar muhafaza için Mg düzeyine kadar tartıldıktan sonra referans amacıyla saklanır. Bunun için şişelerin aliminyum plakalara sarılarak saklanması gereklidir. Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> nin standart dilüsyonlarının bir yıldan daha fazla dayanıklı olabileceği bildirilmektedir (22).

### Aflatoksin Tayini:

İlke: Aflatoksin bulaşmış şüpheli yem numunelerini içerdiği toksinler önce asetonitril ile ekstrakte edilip sonra kolon kromatografisi ile temizlenip ince tabaka kromatografisi ile nitel ve nicel tayininin yapılmasıdır.

### Metod için gerekli reaktif malzeme ve aletler:

- 1 – Aseto - nitril
- 2 – Potasyum Klorür
- 3 – İzoo - oktan (C<sub>8</sub> H<sub>18</sub>)
- 4 – Kloroform
- 5 – Sodyum sülfat (Özel plastik kapta, saf ve susuz)
- 6 – Hidroklorik asid (% 1 lik ve özel renkli şişede)
- 7 – Hekzan ( 68 - 69 °C)
- 8 – Metil alkol
- 9 – Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> standart solusyonu (Özel aliminyum kâğıda sarılı şişelerde saklanır ve yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanır).
- 10 – Toluen
- 11 – Etil asetat
- 12 – Formik asit
- 13 – Ayırma hunisi (P, T, F, E kapaklı, 250 - 500 cc. lik)
- 14 – İnce tabaka kromatografik takımı
- 15 – Mikrometrik şırınga takımı
- 16 – Uzun dalga ultraviyole lâmbası
- 17 – Slica - Gel - G, merck (ince tabaka kromatografisi için)
- 18 – Kolon kromatografisi kolonları ( 40 cc x 30 mm ebadında)
- 19 – Sıcak su banyosu (Termostatlı ve elektrikli)
- 20 – Numune şişesi (dipleri sivri, ağzı özel kapaklı, 8 ml. kapasiteli)
- 21 – Filtre kâğıdı (Whattman No: 41)
- 22 – Erlenmayer (250 - 500 ml. lik)

- 23 – Huniler ( Çeşitli ebatta)
- 24 – Pipetler (1, 2, 10, 25, 50 ml.lik)
- 25 – Mikropipetler (100 mikro litrelik)
- 26 – Adi terazi

#### Çalışma Tekniği:

Numune toz haline getirildikten sonra 25 gr. tartalmış, ağızları özel yaptırılmış kapaklarla kapatılan erlenmayerlere konulmuştur. Bu numune üzerine 90 ml. aseto - nitril, 10 ml. % 4 lük potasyum klorür ilâve edilerek 30 dakika devamlı çalkalanmıştır. Elde edilen ekstrakt Whattman No: 41 filtre kâğıdından başka bir erlenmayere süzülükten sonra süzütüden 50 ml. alınır ve 250 ml. lik ayırma hunisine konur. Bunun üzerine 50 ml. izo-oktan ( $C_8H_{18}$ ) ilâve edilerek çalkalanmış, çalkalama sonucunda 2 ayrı tabaka şekillenir. Lipitlerin ekstrakte olduğu üstteki oktan tabakası atılmış ve alttaki tabakaya tekrar 50 ml. izo - oktan eklenerek yeniden ekstrakte edilir ve üstteki tabaka tekrar atılmıştır.

Altta kalan aseto - nitril tabakasına 12.5 ml. damıtık su katılmış ve toksinler 25 ml. kloroformla ekstrakte edilmiştir. Yine 2 ayrı tabaka şekillenmiş, altta kalan kloroform - aseto - nitril tabakası 9 cm. çapında Whattman No: 41 filtre kâğıdı içerisine konulan anhidr sülfat paketinden geçirilmiştir. Üstteki tabaka atılmış, her defasında 10 ml. kloroform kullanılarak aynı ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Bu ekstraksiyonlarda aynı şekilde anhidr sodyum sülfat paketinden geçirilerek diğer ekstraktlarla birleştirilmiştir. Böylece ekstrakt 1 ler elde edilmiş olur. Sonra ayırma hunisi içerisindeki kalıntıya 1 ml. 0.1 normal hidroklorik asit ve üzerinede 10 ml. kloroform ilâve edilerek iyice çalkalanmış alttaki tabaka alınıp ayrı bir erlenmayere konmuş, üstteki tabaka atılmıştır. Aynı işlem 3 kez tekrar edilmiş, ocakta su banyosunda 5 - 6 saat süre ile buharlaşmaya terk edilmiştir.

#### Aflatoksin purifikasyonu yapmak üzere kolon kromatografisi:

40 x 300 mm. boyutlarında cam kolon kullanılır. Adsorban olarak  $80^{\circ}C$  de 2 saat süreyle aktive edilmiş ve % 1 oranında su ile parsiyel reaktifte edilmiş kolon kromatografisi için hazırlanan silika - gel kullanılmıştır.

#### Kolonların Hazırlanması:

Uçları musluklu cam kolonlar taşıyıcıya, en alt kismada cam pamuk yerleştirilmiş, üstüne 5 g anhidr sodyum sülfat konmuştur. Daha sonra kolon yarısına kadar kloroformla doldurulmuş, üzerine 15 g silika - gel konmuş ve silika - gel'in oturması için musluk alt kısmından açılmış, bir miktar akıtılmıştır. En son olarakta 15 g anhidr sodyum sülfat daha ilâve edilmiş, sodyum sülfatın, silika - gel üzerine tam çökmesini bekledikten sonra kolondaki kloroform, sodyum sülfat'ın üst düzeyine kadar direne edilmiştir.

Bundan sonra doğrudan doğruya kolon kromatografisi ile elüsyonu yapılacak numune ekstrakt'ı (kloroformik) ilâve edilerek önce 150 ml. heksan ile sonrada 150 ml. eter ile ekstrakt'ın içerdiği yağ ve diğer ekstraktif maddelerin ayrılması sağlanmıştır. Kolonda tutulan aflatoksin'lerin sürüklenmesi işlemide 3+ 97 ml. oranına göre hazırlanmış metil alkol ve kloroform karışımından 150 ml. kullanılarak yapılır. Aflatoksin bu karışıma geçer ve bu ekstrakt ağzı açık cam balonlara alınmış, yine aynı şekilde çeker ocak içerisinde su banyosunda uçurulmaya terkedilmiştir.

İnce tabaka plakların hazırlanması:

Silika - Gel - G den 25 gr. alınır ve 50 ml. bidistile su ile sulandırıldıktan sonra 20 x 20 cm. ebadındaki cam plakaya 0. 250 mm. kalınlığında yayılarak, havada kurutulduktan sonra 105°C de 2 saat aktive edilmiş ve kendi desikatöründe saklanmıştır. Bu plaklar kullanılacağı zaman her iki kenarı 2 mm. mesafeden ince, sivri, sert bir kalem ucu ile çizildi, alt sınırından 3 cm. mesafe işaretlenerek bir çizgi çekildi. Bu çizgi üzerinde 14 mm. aralıklarla işaretler konuldu. Bu işaretler arasında standartlar ve numuneler tatbik olundu. Bu standart ve numunelerin en son solvan sınırı en alt çizgiden 10 cm. yüksekliğindeki paralele kadardır.

İnce tabaka kromatografisi:

Cam balonlarda uçurulmaya terk edilen numunelerdeki kloroform, metil alkol karışımı uçurulduktan sonra geride kalan numune ekstraktı özel olarak yaptırılmış ağızları mantar tıpa ile kapatılan özel numune şişelerine alındı. Üzerlerine 10 mililitre kloroform konularak ağızları sıkıca kapatıldı. 20 saniye dikkatlice çalkalandı, bu işlem 3 kez tekrarlandı.

Biriktirilen kloroformlu ekstraktlar konik santrifuj tüpüne konularak 0. 1 mililitreye kadar yoğunlaştırıldı. İyice çalkalanan bu yoğun ekstrakt aflatoksin için özel olarak hazırlanan mikrometrik şırıngaya çekildi ve cam plağın alt kenarında 3 cm. üzerindeki hayali hat boyunca 100 mikrolitre tatbik edildi.

Bütün numuneler ve standartlar (Aflatoksin B<sub>1</sub> , B<sub>2</sub> , G<sub>1</sub> , G<sub>2</sub> ) bu plakaya aynı şekilde uygulandı.

Bu şekilde hazırladığımız plaka 5 - 10 dakika süre ile normal oda hararetinde kurumaya terk edildi. Hazırlanmış lekeleri içeren plaka uygulama noktasından itibaren işaretlenen 10 cm. lik solvan sınırına kadar develope edildi. Bunun içerisinde Toluen (60 ml.) + etil asetat (30 ml.) + formik asit (10 ml) mevcuttur.

Plakalar tanktan çıkarılarak kurutuldu. Uzun ve kısa dalgalı ultraviole ışığı altında beliren lekeler, renk şiddeti ve R<sub>f</sub> değerleri bakımından (R<sub>f</sub> değeri lekelerin uygulanma noktasından itibaren yükseldiği, yüksekliğin mm. olarak solvan yükselme sınırına bölünmesiyle bulunur) standartlarındaki ile karşılaştırıldı. Böylece bilinmiyen lekelerin

tanımı ile yarı nicel olarak miktar tayini yapıldı. Işığa hassas olan aflatoksinlerin parçalanmasını önlemek için bütün bu çalışmalar karartılmış laboratuvarında, zayıf veya sarı bir ışığın altında çeker ocak içerisinde yapılmıştır.

Ayrıca aflatoksin çözeltileriyle bulaşan kaplar, seyreltik asit, saf su ve asetonla yıkanıp kurutulmuştur.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Değişik yem fabrikalarından alınan tavuk yemlerinde yapılan aflatoksin analiz sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

TABLO : 1 – Değişik fabrikalardan alınan 25 gr. yem numunesinde saptanan aflatoksin miktarı (mg.)

Yem No.	Yemin alındığı fabrika ismi		Aflatoksin Komponentleri			
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
1	Özkaşıkçı	Tavuk yemi	20	25	—	—
2	Lalahan	Tavuk yemi	40	30	50	—
3	İzmir	Pamuk tohumu küspesi	50	—	60	—
4	Yem sanayi	Tavuk yemi	60	—	50	—
5	Lalahan	Tavuk yemi	40	—	—	—
6	Lalahan	Tavuk yemi	30	—	—	—
7	Yem Sanayi	Piliç B. yemi	15	—	—	—
8	Yem Sanayi	Tavuk yemi	—	150	—	—
9	Özkaşıkçı	Tavuk yemi	30	—	—	—
10	Özkaşıkçı	Tavuk yemi	—	30	—	—
11	İzmir	Tavuk yemi	20	—	—	—
12	İzmir	Tavuk yemi	10	—	—	—

Araştırmada analizi yapılan yemlerde Aspergillus Flavus mantarlarının meydana getirdiği toplam aflatoksin miktarı 2 no.lu tabloda gösterilmiştir.

TABLO: 2 – Değişik fabrikalardan alınan yemlerde belirlenen toplam aflatoksin miktarı (ppm.)

Yem No.	Aflatoksin Komponentleri				Toplam aflatoksin miktarı
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	
1	0.0008	0.0010	—	—	0.0018
2	0.0016	0.0012	0.0020	—	0.0048
3	0.0020	—	0.0024	—	0.0044
4	0.0024	—	0.0020	—	0.0044
5	0.0016	—	—	—	0.0016
6	0.0012	—	—	—	0.0012
7	0.0006	—	—	—	0.0006
8	—	0.0060	—	—	0.0060
9	0.0012	—	—	—	0.0012
10	—	0.0012	—	—	0.0012
11	0.0008	—	—	—	0.0008
12	0.0004	—	—	—	0.0004

Araştırmamızda farklı yem fabrikalarından alınan 12 adet yem numunesinde yapılan aflatoksin analiz sonuçlarının incelenmesinden anlaşılacağı gibi memleketimizde üretilen yemler genellikle aflatoksin kapsamaktadır. Ancak yemlerde bulunan aflatoksin miktarları literatürdeki değerlerle karşılaştırıldığında, bunların toksin düzeyin altında olduğu görülmektedir.

Yapılan bir araştırmaya (4) göre tavuk yemlerinde bulunan 0.50 ppm. miktarındaki aflatoksin zararlı etki yapmaktadır. Benzer başka bir çalışma sonucuna göre (21) bu miktarın 0.21 ppm. olduğu bildirilmiştir.

Müller ve arkadaşları (31) civciv, ördek yavruları ve hindilerde bir haftalık süre içinde büyümeyi % 25 oranında engelliyen aflatoksin miktarlarının sırasıyla 5.1 ppm., 0.42 ppm. ve 0.25 ppm. olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Diğer taraftan Hamilton ve arkadaşları (20) yumurta tavuğu rasyonlarına günde katılan 2 ppm. miktarındaki aflatoksin tavuklarda verim düşüklüğüne ve canlı ağırlık kaybına neden olduğunu saptamışlardır.

Kratzer ve arkadaşları (28) damızlık tavuk rasyonlarına 2. 7 ppm. miktarında aflatoksin ilâvesi sonucunda yumurtadan civciv çıkma oranının düştüğünü ortaya koymuşlardır.

Araştırmamızda 0. 0060 ppm. olarak saptanan en yüksek aflatoksin miktarı bile yukarıda verilen literatür bildirişlerindeki değerlerin çok altında bulunmaktadır.

Araştırmamızda numuneler Sonbahar mevsiminde alınmış ve analizler aynı mevsimde yapılmıştır. Bu mevsimin yağışlı ve rutubetli olması yemlerde aflatoksin üremesini kolaylaştırıcı etkenlerdendir. Sonuçların tartışılmasında bu durumun gözden ırak tutulması gerektiği kanısındayız. Ancak saptanan aflatoksin miktarlarının bile gerekli önlemler alınmazsa hayvan besleme bakımından ileride önemli verim düşüklüğüne neden olmak suretiyle büyük sorunlar yaratabileceğini söylemek yanılı olmayacaktır. Bu durum aynı zamanda ülkemiz ekonomisinde büyük kayıplara neden olabileceği gibi gerek yetiştirici gerekse halk sağlığı bakımından bu sorunu önemli boyutlara ulaştırabilecektir.

Bu bakımdan yemlerin üretimi, depolanması, taşınması ve saklanması sırasında temizliğe büyük özen gösterilmesi gereklidir. Öte yandan yemlerin aflatoksin üremesine neden olan rutubet ve sıcaklık gibi faktörlerden korunması bu sorunun çözümünde yararlı olacaktır.

## ÖZET

Bu araştırmada Ankara, İzmir Bölgesi çeşitli yem fabrikalarından temin edilen tavuk yemlerinde aflatoksin analizleri yapılmış ve sonuçlar standart değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Analizleri yapılan 12 adet tavuk yemi numunelerinin hiç birisinde toksik seviyeye varan aflatoksin miktarı saptanmamıştır.

## SUMMARY

A study on aflatoxin's in intensiv poultry feed and toxicity in animal feeding.

In this study, poultry feedstuffs obtained from different feed mills from Ankara and İzmir regions, were analysed for aflatoxin. The results were compared with the standard values.

No toxic quantity of aflatoxin was found 12 feedstuff samples analysed.

## LİTERATÜR

- 1 — ALLCROFT, R., CARNAGHAN, R. B. A. (1962): Groundnut toxicity. *Aspergillus Flavus* toxin (aflatoxin) in animal products preliminary comminication *Vet. Rec.*, 74: 863 - 864.
- 2 — 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.
- 3 — ALLCROFT, R., et al. (1968): Excretion of aflatoxin in a lactating cow. *Food Cosmet. Toxicol.* 6: 619 - 625.
- 4 — ANONİM (1969): Informationsdienst Futter und Fütterung. Ed. Fachverband der Futtermittelindustrie E. V., Hamburg.
- 5 — ALPERDEN, İ. (1972): Mycotoxin'lerin gıda hijyeni yönünden önemi ve analiz metodlarının ana prensipleri. *Bornova Araşt. Enst. Derg.*, 13: 89 - 116.
- 6 — ARDA, M. (1975): Mikotoksinler ve mikotosikosis. *Vet. Hek. Der. Derg.*, 45: 5 - 18.
- 7 — AŞKIN, O., DENİZEL, T., KÖŞKER, Ö. (1977): Kuru incir ve ezmelerinde bulunan küflerin izalasyon ve identifikasyon üzerinde araştırmalar. *Ziraat Fak. Yıllığı.* 27: 1.
- 8 — BOCKELEEE, A., MORVAN, A., GILLER, P. (1976): Ruduction de L'aflatoxine de L'aracnide au niveau de la production agricole. *Mycotoxines.* 101 - 104.
- 9 — BRAUNER, L., IRMAK, L. R. (1946): Kriptogamların sistamatiği. İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- 10 — BRIGGS, D. M., WYATT, R. D., and HAMILTON, P. B. (1973): The effect of dietary aflatoxin on semen characteristics of mature broiler breeder males. *Poultry Science.*, 53 (6): 2115 - 2119.
- 11 — CLIFFORD, J. J., REES, K. R. (1966): *Nature.*, 209: 312 - 313.
- 12 — CLIFFORD, J. J., REES, K. R. (1967): *Biochem, J.*, 102: 65 - 75.
- 13 — DEMİRER, M. A. (1973): Süt ve süt mamüllerinde aflatoxin M<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> aranması üzerinde araştırmalar. *A. Ü. Vet. Fak. Derg. XX:* 421 - 443.
- 14 — DEMİRER, M. A. (1973): Sütle aflatoxinlerin ekskrete edilmeleri ve süt mamüllerinde aflatoxin tayin metodlarında son gelişmeler. *A. Ü. Vet. Fak. Derg. XX:* 444 - 453.
- 15 — DEMİRER, M. A. (1974): Bazı peynirlerimizden izole ettiğimiz küfler ve bunların aflatoxin yeteneklerini araştırılması. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, XX: 180 - 198.

- 16 — DENİZEL, T., KÖŞKER, Ö. (1972): A Mycological survey of various kinds of edible nuts commercially available in the U. K white refirence to myco-toxins. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı. 168 - 199.
- 17 — DICKENS, F., JONES, H. E. H. (1963): The carcinoceniğ action of aflatoxin after it's subcutaneous injection in the rat. Brit. Journal of cancer. 17: 691 - 699.
- 18 — FRANK, H. K. (1966): Aflatoxine in lebensmitteln arch lebensmitlehyg. 17: 237 - 247.
- 19 — GURAY, Ö., VURAL, N. (1968): Mycotoxinlerle meydana gelen besin zehir-lemeleri münasebetiyle aflatoxinler üzerine bir araştırma. A. Ü. Tıp Fak. Mec. XXI, 4, 1030 - 1044.
- 20 — HAMILTON, P. B., TUNG, H. T., WYATT, R. D. and DONALDSON, W. E. (1974): Interaction of dietary aflatoxin with vitamine deficiencies Poult. Sci. 53, 3, 871 - 877.
- 21 — HINTZ, H. F., et al. (1967): Proc. Sec. Exp. Biol. Med. 126 - 146.
- 22 — HORWITZ, W., SENCEL, A., PARKAND, D. L., STOLOF, L. (1975): Natu-ral Poisons chapter 26 from official method of analysis of the association of official. Analytical Chemists.
- 23 — İSTANBULLUOĞLU, E. (1977): Küfler ve mikotoksinler. Vet. Hek. Dern. Derg. 47, 4, 55 - 60. Çeviri: Dr. T. F. Sharby.
- 24 — İSTANBULLUOĞLU, E. (1978): Kanatlılarda mikotoksikosis. Vet. Hek. Dern. Derg. 48, 2. 47 - 51. Çeviri: Dr. T. F. Sharby.
- 25 — JACABSON, W. C., WISEMAN, H. G. (1974): The transmission of aflatoxin B<sub>1</sub> in to eggs. Poult. Sci. 53, 5. 1743 - 1745.
- 26 — KENNETHL, A., JOHNR, V. (1973): Increased aflatoxin by aspergillus fla-vus via irradiation. Poult. Sci. 52, 4. 1492 - 1496.
- 27 — KÖŞKER, Ö. (1975): Besinlerde oluşan mikotoksinler ve halk sağlığı. Top. Mah. Ofisi Dergisi. 17, 7 - 9.
- 28 — KRATZER, F. H., BANDY, D., WILEY, M., BOOT, A. W. (1969): Aflatoxin effect in poultry. Proc. Sec. Exptl. Biol. Med. 131, 1281 - 1284.
- 29 — LOPEZ, A. (1967): Aflatoxin concent of groundnuts sold for human con-sumption in Uganda. Lancet II. 1351 - 1355.
- 30 — MARTH, E. H. (1967): Aflatoxin and other mycotoxins in agricultural pro-ducts. Jour. of milk and food tech. 30, 192 - 201.

- 31 — MULLER, R. D., et al. (1970): *The response of chicks Duckings Goslings pheasants and poults to graded levels of aflatoxins.* *Poult. Sci.* 49, 1346 - 1356.
- 32 — OSER, B. L. (1969): *Regulatory aspects of control of mycotoxinst food* Ed. L. A.
- 33 — ROBERTS, B. A. and PATTERSON, D. S. P. (1976): *The multi - mycotoxin screening method and the use of confirmatory tests in the detection of mycotoxins in animal feedstufs.* Central Veterinary Laboratory. Newlaw, Weryb-ridge, Surrey, KT 15, 3 Nb.
- 34 — SARGEANT, K., et al. (1961): *Groundnud toxicity.* *Vet. Rec.* 73, 865.
- 35 — SAWHNEY, D. S., VADEHRA, D. V., BAKER, R. C. (1973): *The metabo-  
lism of C aflatoxins in laying hens.* *Poult. Sci.* 52, 4. 1302 - 1309.
- 36 — STUBBLEFIELD, R. D., et al. (1972): *Aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> and parasiti-  
cical. Thin layer chromatograpy and physical and chemical properties.* *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists.* 55. 762 - 767.
- 37 — ŞANLI, Y., CEYLAN, S., KAYA, S. (1979): *Kişisel konuşma ve laboratuvar  
uygulaması.* A. Ü. Vet. Fak. Farmakoloji Kürsüsü.
- 38 — TULPULE, P. G. (1964): *Effect of feeding aflatoxin to young monkeys.* *Lancet I.* 962 - 963.
- 39 — WESSEL, J. R. (1974): *Proposed tolarance for aflatoxin in peants aflatoxin  
quality control seminar notes.* Chicago, Illinois.
- 40 — ZINTZEN, H. (1976): *Aflatoxin sorunu.* Roche - Vitamin. 9, 1 - 9.