

# ANKARA VE ÇEVRESİNDE ÜRETİLEN YUMURTA ÖRNEKLERİNDE AFLATOXİN REZİDÜLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nesrin TUNCER (\*)

## GİRİŞ

İnsan gıdası olarak 5000 yıldan beri kullanılmakta olan yumurta beslemede biyolojik değer bakımından bütün yiyeceklerin başında yer almaktadır (8). Taze bir yumurta eksojen nitelikte çeşitli beslenme faktörlerini yüksek yoğunlukta ve elverişli oranlarda içerir.

Temiz ve kuru bir ortama yeni yumurtlanmış kabuklu yumurta içeriğinin genellikle steril olduğu, yumurta kabuğunda üretim koşullarına bağlı olarak  $10^2$  -  $10^8$  bakteri/g içerdiği bildirilmektedir (31). Yumurta akında mikroorganizmaların birçoğunun gelişmesi için elverişli bir ortam olmadığı bildirilmekte, buna neden olarak da yumurta akında bulunan ovomukoid adlı protein ile lizozim enziminin mevcudiyeti gösterilmektedir. Ayrıca yumurta akı mikroorganizmaların gelişmesi için elverişli olmayan oldukça yüksek bir pH'ya (yaklaşık 9.6) sahiptir (31).

Genellikle yüksek rutubetli yerlerde saklanan yumurtalarda kabuğun yüzeyinde tüy benzeri küf üremelerine rastlanır. Sonradan bu küf misellerinin kabuktaki gözenek ve çatlaklardan yumurta içine girerek çeşitli (örneğin : Sporotrichum kırmızı, Penicillium yeşil, Cladosporium siyah) renkte bozukluklara neden olabileceği ileri sürülmektedir (31).

---

(\*) Konyo: Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü

Çeşitli toksijenik mantar türleri tarafından sentezlenen mikotoksinlerin, insan ve hayvanlarda Mikotoksikozise neden olduğu yıllardır bilinmektedir. Ergot alkaloidi ve etkisinden «New Testament of the Bible» de bahsedilmektedir. Mikotoksikozis sorunu ilk defa, 1960'da İngiltere'de Brezilya'dan getirilen yer fıstığı küspesini kullanan iki ayrı fabrikanın yaptığı yemleri yiyen hindilerde görülmüştür. O yıllarda nedeni bilinmeyen ve «Turkey X» adı verilen bu hastalıktan 100.000'den fazla hindi ile aynı yemi yiyen 5.000 keklük ve 14.000 ördeğin de öldüğü bildirilmiştir (3). Bu ölüm olaylarının nedenini araştırmak amacıyla yapılan biyolojik ve kimyasal analizlerde ölümlerin *Aspergillus Flavus*'un toksik metabolitinden ileri geldiği bulunmuş ve «Turkey X» hastalığının etkeni olan bu metabolite Aflatoksin adı verilmiştir.

Normalde toprak, hava ve suda bol miktarda bulunan küfler uygun şekilde depolama ve nakledilme işlemlerinin yapılmadığı yem ve yem maddelerinde süratle üreyerek bunların bozulmalarına neden olurlar (7).

Bu çalışma küflü yemlerle beslenme olasılığı fazla olan yumurta tavuklarında yumurtaya geçen Aflatoksin varlığının araştırılması ve böyle yumurtaları tüketen halkın bir Aflatoksikozis riskiyle karşı karşıya olup olmadığını saptamak amacıyla yapılmıştır.

## LİTERATÜR BİLGİSİ

Kumarin türevidir ve Difuranokumarinler adıyla anılan Aflatoksinler bir mikotoksindir. Bunlar *Aspergillus flavus* grubu (*A. flavus* var. *columnalis*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. parasiticus* var. *globus*) diğer *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri (*A. niger*, *A. ventii*, *A. ruber*, *A. ostianus*, *A. ochraceus*, *A. puberulum*, *P. variable*, *A. frequentans*, *P. citrinum*) ve bazı *Rhizopus* türleri mantarlar tarafından sentezlenir. Bu toksijenik mantarların üremesi ve mikotoksin sentezleyebilmeleri için, mantarların genetik özellikleri yanında % 50-60'ın üzerinde oransal rutubet ve 0—60°C arasında ısı gereklidir (4).

Aflatoksin kelimesi çıkışını *Aspergillus flavus*'un A ve Fla harflerinden almıştır. Bu toksin ultraviyole ışığı altında gösterdiği floresan özelliğine göre; mavi floresan veren E<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub>; yeşil floresan veren G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'nin yanısıra hayvanların sütüyle dışarı çıkan

süt toksinleri  $M_1$  ve  $M_2$  bulunmaktadır. Bu 6 ara Aflatoksinde başka  $B_{2a}$ ,  $G_{2a}$ , P, Q, R<sub>o</sub> gibi fraksiyonları da vardır.

Antibiyotiklerden Mitomisin C ve Akinomisin D etki yönünden Aflatoksinlere benzer etki gösterirler. Fakat antibiyotiklere oranla Aflatoksinlerin etkileri çok daha komplekstir (17).

#### Aflatoksinlerin Metabolizma ve Toksikitesi :

Aflatoksinler 300°C'ye kadar dirençlidirler. Fakat kromosülfürük asit gibi kuvvetli asitler ve kostik soda gibi kuvvetli alkali-ler tarafından parçalanabilirler. Toksikiteyi otoklavlama yolu ile azaltılabilir. Toksikite bakımından Aflatoksin tiplerinin birbirine benzemediği, özellikle  $B_1$  ve  $M_1$ 'in en toksik Aflatoksin metaboliti olduğu çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Peros Aflatoksin uygulamasının ördek palazlarındaki toksisitesi (3)

| Aflatoksin türü | Ördek palazlarında LD <sub>50</sub> (50 g/mcg) |
|-----------------|--|
| $B_1$           | 18.2   |
| $B_2$           | 84.8   |
| $G_1$           | 39.2   |
| $G_2$           | 172.5  |
| $M_1$           | 16.0   |
| $M_2$           | 61.4   |

Broyler civcivlerde  $C^{14}$  ile işaretlenmiş Aflatoksinle yapılan bir araştırmada; 14 gün süreyle civcivlere verilen Aflatoksinin herhangi bir toksik etki yapmadığı görülmüştür (21). Yemle alınan  $C^{14}$ 'ün % 90.64'ünün gaita ile atıldığı, vücutta alıkonan  $C^{14}$ 'ün % 11.04'ü kanda, % 9.83'ü karaciğerde, % 4.30'u kalp kasında, % 12.52'si kursakta, % 31.66'sı göğüste ve % 30.63'nün ise bacak kasında toplandığı saptanmıştır.

Bu konuda yapılan bir başka çalışmada (23) Sodyum-acetate- $1-C^{14}$  ile işaretlenmiş Aflatoksinin Beyaz Leghorn piliçlerinde etkileri araştırılmıştır. Piliçlerle ilk Aflatoksin verimesinden 7 gün sonra  $^{14}$ C'ün % 70.16'sının gaita ile atıldığı, en yüksek izotop ak-

tivitesinin safrada, karaciğer ve üreme organlarında bulunduğu tesbit edilmiştir. Aynı araştırmacılar Aflatoksin katılmasının birinci gününde en yüksek izotop aktivitesini sindirim kanalında özellikle kursak ve taşlık içeriğinde bulmuşlardır.

Aflatoksine karşı en hassas kanatlı ördek palazlarıdır. Yapılan araştırmalar (1,2) toksik yerfıstığı küspesi (% 15 oranında) içeren rasyonla beslenen tavukların yumurtalarının ördek palazlarına yedirilmesiyle bunların toksik olup olmadığını saptamak amacıyla test yapılmıştır. Bu tavuklardan elde edilen yumurtalardan 16'sı dondurularak kurutulmuş ve ekstrakte edildikten sonra 7 günlük periyodlarla eşit olarak ördek palazlarına yedirilmiştir. Bu araştırma sonuçlarına göre hayvanlarda herhangi bir toksisite görülmediği bildirilmiştir (1,2). Buna karşılık Newhamshire civcivleri üzerinde yapılan bir başka araştırmada (22) rasyonlarıyla 1.1 ppm düzeyinde Aflatoksin alan bu civcivlerde 14. gün sonunda yüksek mortalite görülmüştür. Aynı zamanda büyüme ve yemin değerlendirilme derecesinin düşük, su tüketiminin ise diğer gruplara nazaran daha fazla olduğu bildirilmiştir.

#### **Aflatoksinlerin Yumurtacı Tavuklar Üzerine Etkileri :**

Yumurta tavuğu rasyonlarında farklı düzeylerde bulunan Aflatoksinlerin yumurta verimini de, rasyondaki miktara göre olumsuz yönde etkileyeceği düşünülerek bir seri araştırmalar yapılmıştır.

Kapsamında 101.000 ppb Aflatoksin bulunan mısırın 2 gün süreyle yumurta tavuklarına yedirilmesi halinde sürüdeki 1000 tavuktan 493'ünün öldüğü, geri kalanların da yumurta veriminin % 5'e kadar düştüğü bildirilmektedir (13).

Bir başka araştırmada, yumurta tavuğu rasyonlarında 16.000 ppb T2 toksinin bulunması halinde 3. haftada yumurta veriminin % 90 oranında düştüğü ortaya konmuştur (28). Aflatoksinlerin etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir başka çalışmada (25) ise yumurt tavuğu rasyonlarına 2; 4 ve 8 ppm düzeyinde Aflatoksin katılmasının, bu rasyonu alan tavuklarda yumurta veriminin önemli derecede düşmesine neden olduğu gözlenmiştir. Aynı araştırmacılar bu tavuklara ait karaciğer ve yumurta analizlerinde Aflatoksin bulunmadığını bildirmişlerdir.

Hamilton ve Garlich (13) rasyonda 2.500 ppb düzeyinde Aflatoksin bulunması halinde yumurta veriminin önemli derecede azaldığını, 10.000 ppb düzeyinde ise yumurta veriminin % 50'ye düştüğünü, 20.000 ppb düzeyinde bulunması halinde ise yumurta veriminin tamamen durduğunu tesbit etmişlerdir.

Benzer bir araştırmada (16) tavuk rasyonlarında 2.500 ppb düzeyinde Aflatoksin bulunmasının yumurta verimine etkisinin olmadığı, aynı tavuklarda 5.000 ppb Aflatoksin düzeyinin önemsiz bir düşmeye neden olduğu, Aflatoksin miktarının 10.000 ppb'ye yükseltilmesi halinde ise yumurta veriminde birdenbire düşmenin olduğu gözlenmiştir.

Beyaz Leghorn yumurta tavukları rasyonlarıyla 20 ppm Aflatoksini aldıklarında 7 günlük yemleme periyodu boyunca verimde herhangi bir değişiklik olmadığı, fakat 8. gün Aflatoksin alan grupta diğer gruplara oranla yumurta veriminde önemli derecede düşmenin olduğu saptanmıştır (10,11).

Yemlerle alınan Aflatoksinlerin yumurta verimini olumsuz yönde etkilediğini bildiren araştırma sonuçlarına karşıt olarak, 2.700 ppb düzeyinde Aflatoksin kapsayan yemlerle 48 gün süre ile beslenen tavuklarda yumurta sayısının 16'dan 21'e yükseldiği, aynı düzeydeki Aflatoksinin kuluçka verimi ve yemin değerlendirilme derecesi üzerine etkili olmadığı belirtilmektedir (20).

#### **Aflatoksinlerin Karaciğer'e Etkisi :**

Yemlerle alınan Aflatoksinler tavuklarda yumurta veriminin düşmesine neden olduğu gibi çeşitli vücut dokularında da değişik ölçüde bozukluklara yol açmaktadır. Örneğin; direkt toksik etkişi olan Aflatoksinler bir tek dozdan sonra bile karaciğerde farklı lezyon ve nekroz oluşturmaktadır. Oysa mikotoksinlere benzeyen Aktinomycin D gibi antibiyotikler ancak letal dozda bu tür bozukluklara neden olmaktadır (17).

Beyaz Leghorn yumurtacı tavuklarla yapılan bir araştırmada, yemlere 5 ve 10 mikrogram/g düzeyinde katılan Aflatoksinin hay-

vanların karaciğerinde önemsiz derecede küçülmeye neden olduğu, 2.5 mikrogram/g düzeyindeki Aflatoksin alan grupta ise karaciğer lipidlerinin aşırı ölçüde düştüğü bildirilmiştir (16).

Rasyonda bulunan 390 ppb düzeyindeki Aflatoksinin civcivlerde nasıl bir etki oluşturacağı araştırılmış ve 8 hafta süreyle bu yemle beslenen civcivlerin kalp, pankreas ve karaciğer dokusu incelenmiş, en fazla zararın karaciğerde ve safra kanalında olduğu bildirilmiştir (19,24).

Tavukçuluk endüstrisinde ekonomik önemi bulunan yumurta tavuklarında karaciğer yağlanma sendromu üzerine çeşitli araştırmalar yapılmış, yüksek düzeydeki Aflatoksinlerin karaciğerde yağlanma benzeri sendromlar oluşturdukları tesbit edilmiştir. Aynı araştırmacılar 5,10 ve 20 mikrogram/g dozda Aflatoksinin karaciğer ağırlığında kontrol grubuna oranla önemli bir artış olduğunu belirtmişlerdir (13,15).

#### **Aflatoksinlerin Yumurta Kalitesine Etkisi :**

Yemde 2.5 mikrogram/g ve yukarı dozlarda Aflatoksin bulunması yumurta büyüklüğünde azalmaya, 10 mikrogram/g düzeyi ise yumurta sarısı ağırlığında % 34'e kadar düşüğe neden olmaktadır. Yüksek düzeyde Aflatoksin alanlarda yumurta sarısı viskozitesinde azalma, yumurta sarısının renginin de diğer gruplara göre daha koyu sarı renkte olduğu gözlenmiştir. Aynı araştırmacılar yemlerde 5 ppm düzeyindeki Aflatoksinin yumurta sarısı yüzdesinde birdenbire düşmeye neden olduğunu bildirmişlerdir (16).

Yumurtlayan Japon bildircinleri üzerinde yapılan bir araştırmada, 6 mikrogram/g Aflatoksin alan grubun kabuksuz yumurta yumurtladığı gözlemlenmiş olup, bu yumurtalar açıldığında yumurta albumini ile sarısının karışık olarak bulunduğu, likid kısmın etrafında 5-7 mm kalınlığında yumurta kabuğu benzeri yapının olduğu saptanmıştır (24).

Aflatoksinlerin yumurta kabuğu kalınlığı, yumurta kabuğu/yumurta ağırlığı oranı ve yumurta ağırlığına etkileri çizelge 2'de görülmektedir.

Çizelge 2. Yumurta kabuğu kalınlığı, yumurta kabuğu/yumurta ağırlığı oranı ile yumurt ağırlığı üzerine Aflatoksinlerin etkisi (13).

| Dozaj<br>mikrogram/g | Yumurta kabuğu<br>kalınlığı (mm) | Kabuk ağırlığı/<br>yumurta ağır. (%) | Yumurta ağırlığı<br>(g) |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 0.00                 | 0.386                            | 9,5                                  | 5,83                    |
| 1,25                 | 0.390                            | 9,6                                  | 57,6                    |
| 2,50                 | 0.397                            | 9,7                                  | 55,8                    |
| 5,00                 | 0.407                            | 10,1                                 | 53,6                    |
| 10,000               | 0.384                            | 9,6                                  | 51,3                    |

### MATERYAL VE METOT

#### Materyal :

#### Numuneler :

Çalışmada toplam 55 adet yumurta kullanıldı. Yumurtalar A.Ü. Veteriner Fakültesi Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Kürsüsünden, A.Ü. Veteriner Fakültesi Deneme Çiftliğinden, Ankara çevresinde yumurta tavukçuluğu yapan çiftliklerden ve bakkallardan sağlanmıştır.

#### Aletler :

- 1 — Mikser : Virtis 23
- 2 — Kromotografik kolon : 22 x 300 mm
- 3 — İnce tabaka kromotografi aygıtı ve ekleri : Desega
- 4 — Developman tankı : Cam tank
- 5 — Ultraviyole lambası : 16 Watt (Pleuger), uzun ve kısa dalga
- 6 — Evaporatör : Büchi
- 7 — Azot bombası, sıcak su trombu sistemi
- 8 — Filtre kağıdı : SS 2043-a (Carl Schleicher and Schull)
- 9 — Mikropipet : Camac (1,2,5,10 mikrolitrelik)
- 10 — Ayırma hunisi : 500 ml'lik
- 11 — Erlanmayer : 250 ml'lik

**Kimyasal Maddeler :**

- 1 — Çözücüler : Aseton, Kloroform, Petrol eteri, Benzin, Asetonitril, Asetik asit (glacial) Benzol, Metanol.
- 2 — Sodyum sülfat : Susuz, granüler.
- 3 — Filter aid : Hyflo Supercel diatoma toprağı.
- 4 — Silicagel (granüler) : E. Merck Silicagel 60, 0.063-0.200 mm (70-230 mesh); 105°C'de 1 saat aktive edildi, kullanılmadan önce 3 ml/100 gr distile su ilave edildi, şiddetle çalkalandı.
- 5 — Sülfirik asit solusyonu : % 25'lik.
- 6 — Silicagel-G (Type 60) : İnce tabaka kromatografisi için.
- 7 — Kurşun asetat çözeltisi : 200 g Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O tartıldı. 500 ml distile suda eritildi, üzerine 3 ml asetik asit ilave edip, distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.
- 8 — Aflatoksin standart çözeltileri : Aflatoksin B<sub>1</sub>'in BenzeneAsetonitril : (98+2) ile AOAC'un tavsiye ettiği metod (26.004 - 26.012)'la ml'de 0.50 mikrogram yoğunlukta standart çözeltisi hazırlandı. Aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'nin yine AOAC'un tavsiye ettiği metod (26.013)'la ml'de 5 mikrogram yoğunlukta Aflatoksin karışım standart çözeltisi hazırlandı.

**Metot :**

Yumurta örneklerinde Aflatoksin rezidü aranması Trucksess ve arkadaşları (32) tarafından bildirilen metottan yararlanılarak aşağıdaki gibi yapılmıştır.

**Numunenin Ekstraksiyonu ve Yağın Uzaklaştırılması :**

50 g sıvı yumurta tartıldı, mikser kavanozuna döküldü. Üzerine 22.5 ml distile su ilave edildikten sonra 1 dakika karıştırıldı.



Sonra 10 g diatoma toprağıve 150 ml aseton ilave edilip mikser yüksek devirde 3 dakika çalıştırıldı. Filtrat süzgeç kağıdı ile 500 ml'lik ölçü silindirine süzüldü.

100 ml filtrat 500 ml'lik erlanmayere alındı, üzerine 10 ml kurşun asetat çözeltisi, 75 ml distile su katılmasıyla erlanmayer 5 dakika şiddetli olarak çalkalandı. Buna 10 gr diatoma toprağı döküldü çalkalanmaya devam edildi. Bu işlem sonunda filtrat süzgeç kağıdından 500 ml'lik ölçü silindirine süzüldü.

160 ml filtrat 500 ml'lik ayırma hunisine aktarıldı, üzerine 50 ml Petrol eteri katıldı 1 dakika kuvvetle çalkalandı, karışımın ayrılması beklendi ve alttaki katman bir kaba alındı. Ayırma hunisinde kalan petrol eter katmanı atıldı. Altteki kısım tekrar ayırma hunisine döküldü, üzerine 25 ml Kloroform katıldı, çalkalandı ve 1 dakika katmanların ayrılması beklendi.

#### **Kolon Kromatografisi :**

Cam yünü ile kromatografik kolonun musluk kısmı gevşek olarak tıkanı, üzerine 2 cm yüksekliğine kadar susuz Sodyum sulfat, daha sonra 10 g granüllü silikajel ilave edildi. Bu işlem sonunda 50 ml kloroformla kolon yıkandı, kloroform süzüldü tekrar 2 cm yüksekliğe kadar susuzsodyum sulfat, silikajel'in üzerine ilave edildi.

Ayırma hunisindeki kloroform katmanı kolona aktarıldı, filtrat 300 ml'lik temiz bir erlanmayere toplandı. Ayırma hunisindeki sulu katman üzerine 10 ml aseton ve ekstrakte ikinci defa 25 ml kloroform katıldı. Ayırma hunisi çalkalandı, katman ayrılması beklendi alttaki kloroform katmanı kolona aktarıldı, filtratın kolonu terk etmesinden sonra son olarak kolon 10 ml Kloroform - Aseton (9+1) ile yıkandı.

Erlanmayerde toplanan ekstraktlar kurumaya yakın olarak Evaporatörde uçuruldu. Kalıntı 1 ml kloroformda çözündürülerek bir konik tüpe alındı, bu işlem 3 defa tekrar edildi. Konik tüpteki kloroform ekstraktı azot gazı akımı altında sıcak su banyosunda (40°) kuruyana kadar uçuruldu. Bu son kalıntı ince tabaka kromatografisi için saklandı.

### Ince Tabaka Kromatografisi :

a) Plakaların hazırlanması : 30 g silikajel tartıldı 300 ml'lik erlenmayere kondu buna 60 ml distile su ilave edildi. 1 dakika kuvvetlice çalkalandı ve yayıcıya döküldü. Daha önceden temizlenen ve kurutulan 20 x 20 cm ebadındaki cam plakalara kalınlığı 0.250 mm olacak şekilde düzgün olarak yayıldı, jel şekilleninceye kadar (10 dakika) beklendi. 80°C'de 2 saat veya 110°C'de 1 saat plakalar aktive edildi. Kullanılincaya kadar desikatörde saklandı.

b) İlk aşama ince tabaka kromatografisi : Kalıntıların plakaya uygulanması için, plakanın alt kenarından 10 cm uzaklıkta solvent sınırını belirlemek için bir çizgi çekildi. Konik tüpteki numune ekstraktı 0,1 ml benzen-asetonitril (98+2)'le çözdürüldü. Camac mikropipetle plakanın 2 cm yukarisından bir doğrultu üzerinde 1-1.5 cm aralıklarla, 2,5 ve 2 tane 10 mikrolitrelik lekeler işaretlendi. Aynı plakaya Aflatoksin B<sub>1</sub> standardından 2,5 ve 10 mikrolitrelik lekeler işaretlendi. 10 mikrolitrelik numune lekelerinden birisine 5 mikrolitre Aflatoksin internal standart olarak uygulandı (AOAC 26.012). En azından bir adet de 5 mikrolitrelik karışım Aflatoksin standartı (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>) uygulandı.

Aflatoksinlerin developmanı kağıtla kaplanmış developman tankında, developman solvanı olarak Benzol + Metanol + Asetik Asit (90 + 5 + 5) kullanıldı. Solvan tanka döküldü, uygulanar plaka tanka yerleştirildi ağzına vazelin sürüldü ve sıkıca kapatıldı. Karanlıkta 10 cm'ye kadar developmanı yapıldı. Plaka tanktan çıkarıldı oda sıcaklığında üzerindeki solvanın uçması beklendi. Karanlıkta uzun dalga UV lambası altında lekeler incelendi

Karışım Aflatoksin standart lekesi 4 fluoresan leke gösterir bunlar R<sub>f</sub> değerleri B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> sırasını izleyerek azalır. Aflatoksin B'ler mavimsi Aflatoksin G'ler yeşil fluoresan gösterirler. Numunedeki fluoresan gösteren leke ile internal standart ilave edilen lekeler incelendi. Standartların R<sub>f</sub> değerlerine çok yakın R<sub>f</sub> değerlerine sahip fluoresan lekeler ve benzeri lekeler belirlendi. İlk aşama ince tabaka kromatografisi negatif numuneleri belirleme testi olduğundan pozitif kabul edilen numunelerde doğrulama testleri ve miktarı tayini yapıldı. Aflatoksin negatif olan numuneler bundan sonraki basamaklarda kullanılmadı.

c) İlk aşama ince tabaka kromatografisinde Aflatoksin pozitif kabul edilen lekelerin doğrulanması : Bu işlem için Przybylski

teknigindeki inorganik bir asidin % 25'lik bir solusyonu kullanılmıŖtır. Bu amaçla % 25'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, birinci ince tabaka kromatografide yapılan plakaya atomizörle hafif Ŗekilde püskürtüldü. Sonuçta renk deęiŖtirmeyenler maskeleyici artık olarak değerlendirildi.

d) Kromatogramın yorumu : İnce tabaka kromatografi plakasında karışım Aflatoksin standart çözeltisi uygun yerde 4 açık belirlenebilir lekeler görüldü. İnternal standart içeren numune lekesindeki florekana leke gösteren Aflatoksinlerin Rf değerleri, standart Aflatoksin lekelerinin Rf değerleri aynı olabilmeli ya da çok az farklı olmalıdır. Numunede görülen Aflatoksin B<sub>1</sub>'e ait fluoresan lekenin, Aflatoksin B<sub>1</sub> standart çözeltinin hangisi ile eŖit fluoresan yoğunlukta olduğu gözle karşılaştırıldı ve hangi standart kısma uyduğu saptandı. Aflatoksin B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> içinde aynı işlem yapıldı.

Kilogramda mikrogram olarak Aflatoksin B<sub>1</sub>'in hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Mikrogram/kg} = \frac{(S \times Y \times V)}{(X \times W)}$$

S = Bilinmeyene eŖit Aflatoksin B<sub>1</sub> standartının mikrolitresi

Y = B<sub>1</sub> standartının yoğunluğu, mikrogram/ml

V = Numune ekstraktının son dilusyonunun mikrolitresi

X = S'ye eŖit (B<sub>1</sub> std.) floresan intensite veren lekeler numune ekstraktı mikrolitresi

W = İnce tabakaya uygulamak için hazırlanan son ekstraktın temsil ettiği numune gr (Son ekstrakt 22.50 gr likit yumurtayı temsil etmektedir).

## S O N U Ç L A R

Ekim 1980 Ŗubat 1981 tarihleri arasında 13 değişik yerlerden alınan toplam 55 yumurtanın analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları numunelerin alındığı kesimlere göre gruplandırılarak çizelge 3'de verilmiştir. Aynı çizelgede de görüldüğü üzere 3 numune ekstraktında kimyasal yöntemle Aflatoksin B<sub>1</sub> sırasıyla 0.002, 0.007 ve 0.007 ppm, numune ekstraktında ise 0.005 ppm düzeyinde Aflatoksin G<sub>1</sub> bulunmuştur. Geri kalan 51 yumurta numunesinde ölçülebilir düzeyde Aflatoksin bulunmamıştır.

**Çizelge 3. Aflatoksin rezidü analizi yapılan yumurta örnekleri ve bulunan sonuçları**

| Yumurtanın alındığı yer        | Analizi yapılan yumurta sayısı | Aflatoksinlerin miktarı (ppm) |                |                |                | Aflatoksinlerin ort. Rf değerleri |                |                |                |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                                |                                | B <sub>1</sub>                | B <sub>2</sub> | G <sub>1</sub> | G <sub>2</sub> | B <sub>1</sub>                    | B <sub>2</sub> | G <sub>1</sub> | G <sub>2</sub> |
| A.Ü. Vet. Fak. Hayv. B.        | 8                              | —                             | —              | 0,005          | —              | —                                 | —              | 0,31           | —              |
| E. Bakkal                      | 2                              | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |
| F. Bakkal                      | 5                              | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |
| D. Bakkal                      | 3                              | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |
| Lalahan (Çiftlik)              | 3                              | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |
| Çubuk »                        | 3                              | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |
| A.Ü. Vet. Fak. Deneme Çiftliği | 3                              | 0,002                         | —              | —              | —              | 0,37                              | —              | —              | —              |
| Y. Bakkal                      | 3                              | 0,007                         | —              | —              | —              | 0,37                              | —              | —              | —              |
| Yenimahalle (Çiftlik)          | 10                             | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |
| Y. Bakkal                      | 3                              | 0,007                         | —              | —              | —              | 0,37                              | —              | —              | —              |
| Etlik (Çiftlik)                | 3                              | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |
| Gölbashi (Çiftlik)             | 3                              | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |
| V. Bakkal                      | 6                              | —                             | —              | —              | —              | —                                 | —              | —              | —              |

### T A R T I Ş M A

Ülkemizde gerek kanatlı gerekse küçük ve büyükbaş hayvan yemlerini hazırlama tekniklerinin yetersiz, depolama ve koruma olanakları ile koşullarının çoğu yerlerde uygunsuz olması nedeniyle bu tür yemlerin küflenme olasılığı yüksek düzeydedir. Demirer ve arkadaşları (7) yaptıkları bir araştırmada piyasada satılan 81 adet 22 çeşit yem örneğinde küf mantarı sayımı yapmışlardır. Araştırmacılar 4 yem çeşidi dışında kalan örneklerde 10.000'nin üzerinde koloni tesbit etmişlerdir. Buna göre yurdumuzda hayvan besleme alanında kullanılan yem ve yem maddelerinin küf bakımından çok bulaşık olduğu ileri sürülmüştür.

Aflatoksinlerin en önemli komponenti olan Aflatoksin B<sub>1</sub> Aflatoksinler içinde en toksin metabolittir. Aflatoksin B<sub>2</sub>'nin toksisitesi B<sub>1</sub>'in 1/4'üne eşittir (6). Bu nedenle dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda Aflatoksin B<sub>1</sub> ön planda tutulmaktadır.

Tropik bölgelerde yaşayan insanların, diğer besin maddelerini yeterince bulamadıkları için, yerfıstığı tanelerini bol miktarda tükettikleri, özellikle *Aspergillus flavus* ile bulaşık yerfıstığını yiyen

bu insanlarda primer karaciğer kanserinin yaygın bir biçimde görüldüğü bildirilmektedir (12). Bu durum Aflatoksin konusunun özellikle Aflavus'un önemini ortaya koymaktadır. Öte yandan son yıllarda proteince zengin olan yarfıstığı unu çocuk mamalarına katılmaktadır. Yapılan araştırmalar Aflatoksinlerin yarfıstığı ununda bulunma olasılığının fazla olduğunu göstermiştir. Bu amaçla Birleşmiş Milletler Teşkilatının çeşitli kuruluşları ,FAO, WHO) protein ikamelerinde Aflatoksin miktarının en fazla 30 mikrogram/kg olması ve bu düzeyi geçmemesinin gerektiği kararını almıştır (9).

Literatür incelemesinden de anlaşılacağı gibi yapılan çalışmaların büyük bir bölümünde Aflatoksin ile bulaşık yemeklerle beslenen yumurta tavuklarından elde edilen yumurtalarda Aflatoksin B<sub>1</sub> araştırılmıştır. Bu tavukların yedikleri kirlenmiş yemlerle alınan Aflatoksin miktarı ile, yumurtada bulunan ortalama Aflatoksin miktarı arasında aşağı yukarı linear bir ilişkinin olduğu Jacobson ve arkadaşları (18) tarafından ileri sürülmüştür. Bu araştırmacılar yaptıkları araştırmada 0.1 ppm Aflatoksin B<sub>1</sub> kapsıyan yemle beslenen tavuk yumurtalarında benzer miktarda 0.4 ve 0.2 ppm Aflatoksinli yemle beslenen tavukların yumurtalarının % 38-48'inde 0.048 mikrogramdan fazla Aflatoksin B<sub>1</sub> bulmuşlardır.

Trucksess ve arkadaşları (32) deneysel olarak kontamine edilmiş yem verilen tavukların yumurtalarında 1 ng/g ve daha düşük düzeyde Aflatoksin B<sub>1</sub> saptamışlardır. Recovery denemelerinde yumurta içeriğine 0.5 ng/g Aflatoksin B<sub>1</sub> katılmış, analiz sonucunda katılan miktarın % 75'ini geri alabilmişlerdir. Aynı yöntemi kullanarak yaptığımız Recovery denemelerinde yöntemin hemen hemen aynı derecede duyarlı olduğu tesbit edildi.

Tavuk rasyonlarına katılan 200 ng/g düzeyinde Aflatoksin içeriğinin 0.1 ng/g düzeyinde yumurtaya geçtiği belirlenmiştir (32). Brown ve Abrahams (5) rasyonda 0.75 ppm düzeyde Aflatoksini alan tavukların yumurtalarında Aflatoksin bulunmadığını bildirmişlerdir. Rasyonlarına 2,4 ve 8 ppm düzeylerinde Aflatoksin katılan tavukların yumurtalarında yapılan analiz sonucunda Aflatoksin veya benzer floresan gösteren metabolit bulunamamıştır (25). Bu çalışmalarda yumurta tavuğu rasyonlarına katılan yüksek düzeyde Aflatoksinlerin yumurtaya geçtiğini ortaya koymaktadır. Çizelge 3'de verilen Araştırma sonuçlarımıza dikkat edildiğinde yukarıda özetlenen bilimsel gerçeğin aynen ülkemizde yürütü-

len tavukçuluk işletmeleri ve birimleri içinde geçerli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Aflatoksin B<sub>1</sub>'in yüksek düzeyde bulunması halinde, az miktarda da Aflatoksin G<sub>1</sub>'inde bulunabileceği bildirilmiş (6) ise de yaptığımız araştırmada analizi yapılan numunelerin 1'inde sadece Aflatoksin G<sub>1</sub> saptanmıştır. Nitekim Güray ve arkadaşlarının (12) yaptığı araştırma sonuçlarında bizim bulgularımızı doğrular niteliktedir.

Stoloff ve Trucksess (29) yaptıkları araştırmada 35 değişik yerden topladıkları yumurta örneklerinin sadece birinde 0.06 ng/g düzeyinde Aflatoksin tesbit etmişlerdir. Aflatoksin bulunan yumurta sayısının analizi yapılan toplam yumurta içindeki payı % 0.9'dur. Oysa yaptığımız araştırmada değişik yerlerden toplanan 55 yumurtanın 4'ünde Aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub> saptanmış olup bu miktar analizi yapılan yumurta sayısının % 7.2'sini oluşturmuştur. Buna göre elde ettiğimiz sonuçlar literatür verilere göre daha yüksektir. Ayrıca üzerinde çalıştığımız yumurta örneklerinin miktarı literatürde bildirilen (29) yumurta sayısının yaklaşık yarısı kadar olduğu halde Aflatoksin saptanan yumurta sayısının fazla oluşu dikkati çekmektedir.

Başta gelişme çağındaki çocuklar olmak üzere her yaşta insanın beslenmesinde özel bir yeri bulunan yumurtanın Aflatoksinlerle kirlenme tehlikesinin yakın bir gelecekte önem kazanabileceği kabul edilebilir. Araştırma sonuçlarımız dikkate alındığında yurdumuzda kullanılan hayvan yemlerinin Aflatoksin açısından sürekli kontrolünün yapılması, diğer ülkelerde olduğu gibi (30) memleketimizde de yemlerde Aflatoksin sınırının bir an önce ortaya konulmasını yararlı olacağı bir gerçek olarak ortaya çıkmaktadır.

## Ö Z E T

Bu çalışma küflü yemlerle beslenme olasılığı bulunan yumurtacı tavuklarda, yumurtaya geçen Aflatoksin varlığının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Araştırmada 13 değişik yerden toplanan 55 yumurta Aflatoksin bakımından analiz edilmiştir.

Araştırmamız sonuçlarına göre, 3 numune ekstraktında 0.002, 0.007 ve 0.007 ppm düzeyinde Aflatoksin B<sub>1</sub>; 1 numune ekstraktında

ise 0.005 ppm düzeyde Aflatoksin G<sub>1</sub> bulunmuştur. Geri kalan 51 yumurtada ölçülebilir düzeyde Aflatoksin saptanamamıştır.

## S U M M A R Y

In this study, the existence of aflatoxin in eggs obtained from laying hens feed with possibly mycotoxin contaminated feed.

55 eggs were used in the study. According to our results. 3 samples contained aflatoxin B<sub>1</sub> at the amount of 0.002, 0.007 and 0.007 ppm respectively and in one sample had aflatoxin G<sub>1</sub> at the amount of 0.005 ppm. Remaining samples did not contain aflatoxin at the measurable amount.

## L İ T E R A T Ü R

- 1 — ALLCROFT, R., CARNAGHAN, R.B.A. (1962) Groundnut toxicity-Aspergillus flavus toxin (aflatoxin) in animal product: Preliminary communication. The Vet. Rec. 74 (31) : 863-864.
- 2 — ALLCROFT, R., CARNAGHAN, R.B.A. (1963) : Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food product from animals fed toxic ground meal. The Vet.Rec. 75 (10).
- 3 — ARAFA, A.S., HARMS, R.H., MILES, R.D., BLOOMER, R.T. (1979) : Review of Aflatoxicosis in animal production, Feedstuffs, Feature section Sep. 17.
- 4 — ARDA M. (1979) : Mikoloji. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları 366, Ders Kitabı 261.
- 5 — BROWN, J.M.M., ABRAHAMS, L. (1965) : Biochemical studies on Aflatoxicosis. Onderstepoort J. Vet. Res. 32 (1) : 119-146.
- 6 — COOMES, T.J., CROWTHER, P.C., FRANCIS, B.J. and STEWERS, L. (1965) : The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials. The Analyst. 90, 492.
- 7 — DEMİRER, M.A., AKKILIÇ, M., ÖZALP, E., KAYMAZ, Ş., DİNÇER, B., İNAN, T. (1979) : Piyasada satılan bazı karma yemlerin ve yem maddelerinin mycofloralarının belirlenmesi ve bunlarda bulunan Aspergillus suşlarının Aflatoxin yapabilme yeteneklerinin araştırılması. A.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi. Cilt: 26, No: 3-4.
- 8 — DİLMEN, S. (1971) : Yumurtanın beslenme değeri ve tüketimi üzerinde yeni görüşler. Afyon Veteriner Bölge Gıda Kontrol Laboratuvarı Dergisi. Cilt: 2 (2) : 20-39.
- 9 — FAO/WHO (1967) : Expert committee on nutrition. Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser., 377. Geneva 1967.
- 10 — GARLICH, J.D., TUNG, H.T., HAMILTON, P.B. (1972) : Delayed effects of aflatoxin on egg production. Poultry Sci. 51 (2).
- 11 — GARLICH, J.D., TUNG, H.T., HAMILTON, P.B. (1973) : The effects of short term feeding of aflatoxin on egg production and some plasma constituents of the laying hen. Poultry Sci. 52: 2206-2211.

- 12 — GÜRAY, O., VURAL, N. (1968) : Mycotoxinlerle meydana gelen besin zehirlenmeleri münasebetiyle Aflatoxinler üzerinde bir araştırma. A.Ü.T.F. Mec. XXI (IV) : 1030-1044.
- 13 — HAMILTON, P.B., GARLICH, J.D. (1971) : Aflatoxin as a possible cause of fatty liver syndrome. Poultry Sci. 50: 800.
- 14 — HAMILTON P.B. (1971) : A natural and extremely severe occurrence of Aflatoxicosis in laying hens. Poultry Sci. 50: 1880.
- 15 — HAMILTON, P.B., GARLICH, J.D. (1972) : Failure of vitamin supplementation to alter fatty liver syndrome caused by aflatoxin. Poultry Sci. 51:688.
- 16 — HUFF, W.E., WYATT, R.D., HAMILTON P.B. (1975) : Effects of dietary aflatoxin on certain egg yolk parameters. Poultry Sci. 54: 2014.
- 17 — JACQUET, J. (1972) : Aflatoxines et antibiotiques. Revue d'immunologie. 36, 187.
- 18 — JACOBSON, W.C., WISEMAN, H.C. (1974) : The transmission of aflatoxin B<sub>1</sub> into eggs. Poultry Sci. 53: 1743.
- 19 — KELLEY, V.C., MORA, E.C. (1976) : Ultrastructural changes induced by chronic Aflatoxicosis in chickens. Poultry Sci. 55: 317-324.
- 20 — KRATZER, F.H., BANDY, D., WILEY, M., BOOTH, A.N. (1969) : Aflatoxin effect in poultry. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131: 1281.
- 21 — MABBE, M.S., CHIPLEY, J.R. (1973) : Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> —C<sup>14</sup> in broiler chickens. App. Microbiology. 25 (5): 763-769.
- 22 — RAJION, M.A., PARRELL, D.J. (1976) : Energy and nitrogen metabolism of diseased chickens, : Aflatoxicosis. Poultry Sci. 17: 79-92.
- 23 — SAWHNEY, D.S., VADEHRA, D.V., BAKER, R.C. (1972) : The metabolism and toxicology of C<sup>14</sup> aflatoxins in laying hens. Poultry Sci. 51 (5).
- 24 — SAWHNEY, D.S., VADEHRA, D.V., BACKER, R.C. (1973) : Aflatoxicosis in the laying Japanese quail. Poultry Sci. 52: 465.
- 25 — SIMS W.M., KELLEY, D.C., SANFORD, P.E. (1970) : A study of aflatoxicosis in laying hens. Poultry Sci. 49: 1082.
- 26 — SMITH, J.W., HAMILTON, P.B. (1970) : Aflatoxicosis in the broiler chickens. Poultry Sci. 49: 207.
- 27 — SMITH, R.B., GRIFFIN, J.B., HAMILTON, P.B. (1975) : Survey of aflatoxicosis in farm animals. App. Environ Mic. 31 (3) : 385.
- 28 — SPEERS, G.M., MIROCHA, C.J., CHRISTIANSEN, C.M., BEHRNES, J.C. (1977) : Effect of laying hens of feeding corn invaded by two species of Fusarium and pure T2 mycotoxin. Poultry Sci. 56: 98.
- 29 — STOLOFF, L., TRUCKSESS, M.W. (1978) : Survey for aflatoxin B<sub>1</sub> in chicken eggs. J. Assoc. off Anal. Chem. 61 (4).
- 30 — STRZELECKI, E.L., GASIOROWSKA, U.W. (1974) : Aflatoxin B<sub>1</sub> in feed-stuffs. Zbl. Vet. Med. B, 21, 395-400.
- 31 — TEKİNŞEN, O.C. : Yumurta, Tavukçuluk Derneği Yayınları 1.
- 32 — TRUCKSESS, M.W., LEONARD, S., WALTER, A.P., ALVA, F.C., LOUISE, S.L., ANONY, O.F. (1977) : Thin layer chromatographic determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in eggs. Journal AOAC. 60 (4).
- 33 — ZINTZEN, H. (1976) : Aflatoxin sorunu. Roche (Vitamin), sayı: 9.