

## YAĞLI TOHUM KÜSPELERİNDE AFLATOXİN B<sub>1</sub> TARAMASI

Faik ALP (\*)

Nesrin TUNCER (\*\*)

Aysel ÖZSOY (\*)

### Ö Z E T

İngiltere'de 1960 yılında hindilerde sebebi meçhul bir hastalığın dikkatleri çekmesi üzerine Aflatoxinler hakkında ilk çalışmalara başlanmıştır. Yapılan araştırmalarda bunun yer fıstıklarında gelişen küflerin toksik metabolitlerinden, kaynaklandığı tesbit edilmiştir. ASPERGELLUS FOVUS link ex Fries ve ASPERGELLUS PARAZITCUS önemli cinsleridir. Aflatoxin B<sub>1</sub> izole edilen metabolitlerinden bazıları olup hayvanlarda ölümlere neden olabilmektedir. Aflatoxin hayvan yemlerinde her türlü gıda maddelerinde meydana gelir ve bunları yiyenlerde Aflatoksikosisi oluşturur. Hayvanlarda ve tavuklarda hemoraji, anoraxia, karaciğerde, böbrekte patolojik bozukluklar ile yumurta verimi düşüklüğü ve ölümlere neden olarak ekonomik zararlara neden olur.

Memleketimizde fabrika yemlerinde, Aflatoxin seviyelerinin tesbiti için bu araştırma coğrafi bölgelere göre yapılmıştır.

Aflatoxin arama metodu olarak ince satılı krotorafisi-ultraviole kullanılmıştır. Toplanan numunelerde % 12 müsbet aflatoxin tesbit edilmiştir. Seviyeleri 0,010 - 0,016 ppm arasında bulunmuştur. Miktarı tayinlerde, Kromotogramlardaki ağırlık ve alan ilişkisine dayanan metod kullanılmıştır.

(\*) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Dr. Vet. Hek.

(\*\*) Konya Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü

## S U M M A R Y

### DETECTION OF AFLATOXIN B<sub>1</sub> IN FEEDS AND OIL CAKES

First research began on aflatoxin during 1960 in England upon attention was drawn to an unknown disease among turkey.

Aflatoxicosis metabolits have been found responsible for the disease. *ASPERGELLUS FLAVUS* link ex Fries and *ASPERGELLUS PARVAITCUS* are most important genera in various mould, produce aflatoxin in feeds using and feeding.

Aflatoxicosis has been reported for man and animal such as cattle dogs, sheps, cats and avian species like ducks and turkeys. Aflatoxin in animals has caused anorexis, listless, pathological changes in the liver, bileduct, kidney, decreased egg production, high mortality.

Study was made to find out feeds having aflatoxin metabolits during manufacturing and storage condition. Feed samples from the factory were collected according to geographic regions.

Thin-layer chromatography is performed on silicagel with ultra-violet % 12 positive aflatoxin B<sub>1</sub> isolated in collected feed samples. Between 0.010 - 0.016 ppm.

Quantitative determinations are made on chromatoplates according to relation between the Weight-area in the spots.

## G İ R İ Ő

Aflatoxinler, bir Mikotoxin olup mantarların metabolitleridir. Bunlar havada, toprakta bol miktarda bulunur. Muhtelif yollarla yemlere bulaşır. Elverişli şartları bulunduğu anda çoğalmaya ve toxin üretmeye başlar (4, 5, 6).

Aspergillus ve penisillicum cinsleri önemli olup bunlar içinde bazı türler toxin üretmektedir (6, 8). Toksinler organik kimyasal bir yapıya sahip olup canlılar için zehirleyici etki yapar. Besinlerin bozulmasına neden olduğu gibi metabolitleri ile de hayvan ve insanlarda çeşitli bozukluklara neden olurlar. Hayvanlardaki bozukluklar ilk defa 1960 yunda İngiltere'de hindilerde büyük ölümlere (2, 7, 11, 12) neden olan sebebi meçhul bir hastalığın görülmesi üzerine dikkati çekmiştir (9, 17). Yapılan çalışmalar da Aflatoxin tespit edilmiştir.

Aflatoxinin farklı yapıda ve etkide tipleri mevcut olup bunlar B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>'dir. Bunların stabil yapıları olmayıp B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>'ye kimyasal yolla dönüşebilmektedir. Küflerin üremesi ve toxin vermeleri için bazı optimal şartların bulunması icap etmektedir. *Aspergillus flavus* 36-38 C. *Aspergillus parasiticus* ise 30-35 C. gelişmektedir. Rutubet ise % 80-90 olmalıdır. Yemin rutubeti ise % 15'den yüksek olmalıdır (4, 9).

Tavuklarda immüniteyi ve hastalıklara dayanmayı düşürmekte. yemden yararlanma azalmakta, yumurta ve et veriminde düşüklük görülmektedir (4, 6).

Aflatoxinler, bazı organik insektisitlerde görüldüğü gibi yumurtaya yemle geçerek embriyoya ulaşabilmektedir. Bu suretle yumurta veriminin düşmesi ve döllenmenin azaldığı pek çok araştırmada kanıtlanmıştır (15, 16).

Sığırlarda körlük, sallantılı yürüyüş, dış gıcırdatma, ishal vardır. Aflatoxin süte geçer ve böyle sütleri emen yavrularda ve insanlarda benzer semptomlar görülür. Diğer hayvanlarda olduğu gibi otopside karaciğer lezyonları tipik işaretlerdir (4, 6, 10).

## MATERYAL ve METOT

### I. MATERYAL

#### A. ALETLER

- 1 — Kromotografik kolon 22x300
- 2 — İnce tabaka kromotografi DESEGA
- 3 — Ultraviyole lambası DESEGA
- 4 — Evaporatör
- 5 — Cam malzeme

#### B. KİMYASAL MADDELER

- 1 — Hexan
- 2 — Kloroform
- 3 — Sodyum Sülfat
- 4 — Diatoma Toprağı

- 5 — Slica-Agel E. mercek 60 0, 063-0,200 mm (70-230 m $\mu$ k)
- 6 — Slicagel 60 H kromotograf için
- 7 — Kurşun Asetat Pb(CH<sub>3</sub> COOH)<sub>2</sub> 3H<sub>2</sub>O % 20 suda +  
3 ml asetik asit
- 8 — Aflatoxin B standartları

## II. METOD

### 1. NUMUNENİN HAZIRLANMASI :

25 gram numune, 100 ml. Aseton — Su (85-15) ve 5 gram Diatone toprağı konarak karıştırılır. Süzüntü üstüne 5 ml. kurşun asetat ve 50 ml. su ilavesi ve müteakiben 2,5 ml. doymuş sodyum klorür konarak karıştırılır. Süzüntü üzerine 25 ml. Hexan konarak separatorde çalkalanır. Kalan sulu kısım üzerine 25 ml. % 5 sodyum klorür ve 25 ml. kloroformla tekrar 2 defa çalkalanarak Aflatoxin kloroforma alınmış olur.

### 2. KOLON HAZIRLANMASI :

Şekil 1'de görüldüğü şekilde kromotografik kolon doldurulur. 50 ml. kloroformla yıkandıktan sonra üzerine aynı miktar sodyum sülfat konarak separatordeki kloroform yavaşça alttaki konik behere damla damla alınır. Bu arada alttan ve üstten yapılacak ısıtma ve üfürmelerle kloroformdaki Aflatoxin etrafa bulaşarak kaybı önlenmiş olur.

### 3. PLAKLARIN HAZIRLANMASI :

30 gram silicagel - 60 ml. su ile hazırlanan vasat cam plaklara dökülür. (0,250 mm.) 80°C aktivasyondan sonra kullanılır.

### 4. UYGULAMA :

Beherdeki madde miktarı kafi Benzen - Asetonitril (98 - 2) karışımı ile yıkanmayı müteâkip 10 cm.'lik tavan sınırlı plaklara uygulanır. Yan tarafına muhtelif dilisyonlu Aflatoxin B<sub>1</sub> standartları uygulanması müteâkip plak Benzol - Metano - Asetik asit (90-5-5) inkisaf tankına yerleştirilir ve gelişmeyi müteâkip tanktan çıkarılarak kurutulur.

### 5. DEĞERLENDİRME :

a — Ultraviyole Uygulaması : Aflatoxin B<sub>1</sub> mavi floresan verir (RF 0,40 20°C) % 25 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> uygulaması ile gerçek Aflatoxin B<sub>1</sub> diğer lekelerden ayrılır.

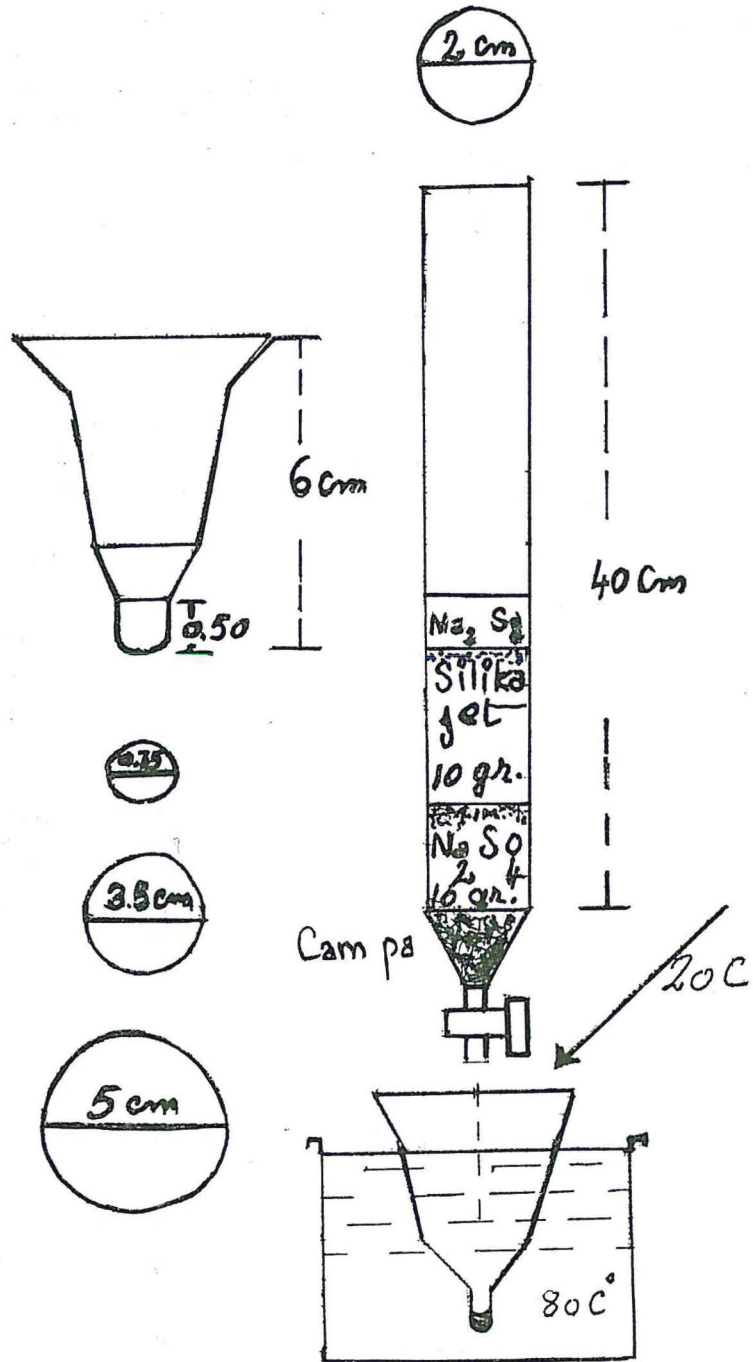
b — Miktarı Tayin : S. Jean Purdy (14) ve Abbott (1) tarafından uygulanan Ağırlık-Alan ilişkisinden kaynaklanan metod kullanılmıştır. İnce satılı kromotografide «lekenin karekökü - ağırlığın logaritması ile linear bir ilişki halindedir», çalışması yardımı ile yemlerdeki Aflatoxin B<sub>1</sub> miktarı tayin edilmiştir.

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Yurdumuzda yemler gerek üretim aşamasında ve gerekse hayvan beslenmesinde kullanılırken dış etkenlere karşı koruma tedbirlerine pek az dikkat edilmektedir. Dış etkenlerin başında küf ve mantarlar gelmektedir. Bunların metabolitleri içinde diğerlerine göre en toksik olan Aflatoxin B<sub>1</sub> olduğundan araştırmada bunun üzerinde durulmuştur. Yer fıstıkları *Aspergillus Flavus* için iyi bir ortam teşkil ettiğinden, yağlı tohum küspelerinin önemliler olduğundan araştırmamızda yağlı tohum küspesi katılan yemler numune olarak kullanılmıştır.

Çalışmamız yurt düzeyindeki fabrika yemlerini kapsadığından 6 Bölgenin muhtelif illerdeki özel veya devlete ait fabrikalara gidilerek, numuneler mümkün mertebe uygun olmayan şartlarda bulunan depolardan, yem numuneleri alınmıştır.

BÖLGESİ	İ L İ	NUMUNE ADEDİ	MÜSBET ADEDİ
Güney Anadolu B.	Adana, Antalya	49	6
Batı Anadolu B.	Denizli, İzmir, Balıkesir	32	5
Orta Anadolu B.	Ankara, Konya, Eskişehir	39	6
Doğu Anadolu B.	Erzurum, Diyarbakır, Elazığ	48	3
Karadeniz B.	Samsun, Ordu	27	4
Marmara B.	İstanbul, İzmit Bursa	47	5
	<b>Yekûn .....</b>	<b>242</b>	<b>29</b>



Aflatoxinler C.H.O. yapısında olup önemli B ve G tipleri ve bunlarında B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> - G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> alt tipleri vardır. Karbon sayılarını aynı H ve O sayıları çok az fark gösterir molekül ağırlıkları birbirine yakın olup 312-330 arası değişir. Ultraviyolede B'ler mavi, G'ler yeşil, yeşil-mavi olarak görülür.

Bir günlük ördelerde yapılan toxite testlerinde B<sub>1</sub> en fazla toksik, sonra G<sub>1</sub> % 50 az toksik olduğu saptandı. B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub>'nin çok daha az toksik olduğu görülür.

Aflatoxin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub> birbirine yakın olup, B<sub>1</sub> hidrogenize edilmekle G<sub>2</sub>'ye dönüştürülebilmiştir. Aynı şekilde B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub> — B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub>'ye dönmekte tabii olarak B<sub>1</sub> yanında B<sub>2</sub>'de bulunabilmektedir. 6-7 gün içinde süt, gaita, idrarla çok az miktarı değişmeden atılmaktadır. 48 saatte % 90 atılmaktadır.

Yaptığımız çalışmada numuneler yemlerin uzun süre bekletildiği muhit derecesinin 16-20°C rutubet % 60-85 arasında bulunan yerlerden alınmıştır. Ayrıca yemlerde herhangi bir yağlı tohum küpsininin bulunmasına dikkat edilmiştir.

Çalışmada kullandığımız metod AOAC (15) uygulamasının bazı modifie edilmiş şekli kullanıldı. Bütün süzmelerde kâğıt yerine cam pamuğu kullanıldı, (Bulaşmadan kaynaklanan madde kaybına engel olmak için) ve farklı sonuç alınmıştır. Ayrıca kolondan geçen kloroform, şekilde görülen özel imal ettirilen, beher içine toplanmış ve burada da bulaşma asgari hadde indirilmiştir. Bu surette madde ufak bir boşluk içine toplanmakta ve plaklara istenen miktar nakil edilebilmektedir. Özel beher 80°C'den yukarı olmayan su banyosuna oturtularak, üstten hava tabancasının ılık (oda derecesinde) fazile sürekli üfürülmektedir. Kolonun hızı saniyede 1 damla olarak ayarlanmaktadır. Miktarı tayinler için (1, 14) yeni bir metod tarafımızdan aflatoxin B<sub>1</sub> için uygulanmıştır. Olumlu sonuç alınmıştır. Yapılan çalışmalarda, ince satıh kromatografisinde plaklardaki leke ile lekenin ihtiva ettiği madde arasında bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur. «Lekenin alanının karakök değeri ile ihtiva ettiği maddenin ağırlık değerinin logaritması linear bir ilişki halindedir.»

Burada en büyük zorluk lekenn alanının hesaplanmasından kaynaklanmaktadır. Biz bunu lekenin alanı üzerine mikrometrik kâğıt koymak ve sonra fotokopisini çekmek sureti ile hallettik. Le-

kenin alanına isabet eden kare alanları toplamı lekenin alanını vermektedir. Aynı uygulama tarafımızdan paration üzerine uygulanmıştır (3).

Çalışmada muhtelif bölgelerdeki fabrika yemlerini temsil eden 242 adet numune toplanmıştır. Bunların içinde 29 adet yem numunesinde aflatoxin B<sub>1</sub> müsbet bulunmuştur. Buna göre müsbet aflatoxin yüzdesi 12 olmuştur. Bu ise aflatoxin zehirlenmelerinde önemli bir miktar olmadığı kanaatındayız. Ayrıca müsbet vak'alardaki Aflatoxin B<sub>1</sub> seviyeleri en düşük 0,010 ppm ve en yüksek değer ise 0,016 ppm bulunmuştur. Bu miktarlar hayvanlarda ciddi Aflatoxicosis yaratmamaktır. Hartley (10) yaptığı araştırmada ördek yavrularında aflatoxin B<sub>1</sub> LD<sub>50</sub> 30 mcr. olduğunu bildirmiştir. Ancak bu tesbitler kontrol altında imalat yapan fabrikalardan elde edilmiştir. Numunelerimiz aflatoxinlerin gelişmesine uygun yerlerden alınmasına rağmen bu yemler hayvan yemi olarak kullanılabilir evsafıdır.

Yem bayiiilerindeki şartlar ile hayvan sahibinin ambarındaki şartlar pek çok yerlerde ço k daha kötü 'durum arzettiğini bizzat tekik ettik. Eğer aflatoxikosis vak'ası varsa nedenleri buralardaki şartlarda aranmalıdır.

Yemlerdeki Aflatoxin seviyelerini tam anlamıyla ortaya koymak için ayrıca yetiştiricilerdeki yemlerin durumları da ortaya konulmalıdır.

## L İ T E R A T Ü R

- 1 — ABBOTT, D.C., BUNTING, J.A. and THOMSON (1964) : The thin-layer Chromatographic Determination of Triazine Herbicides in Soil and Water. Analyst Vol. 90, 356, 361.
- 2 — ALLCROFT, Ruth. and LEWIS GWYNETH (1963) : Groundnut Toxicity in Cattle: Experimental Poisoning of Calves and a Report on clinical Effets in older Cattle. The Veterinary. 487-493.
- 3 — ALP, FAİK., GİRGİN HAMDİ., DIDIOĞLU, BİRSEN (1985) : Parationla bulaşmış tavuk yumurtalarının embriyonal gelişmelerindeki Tokikolojik ve Patolojik değişiklikler üzerinde araştırma. Doğa Bilim Dergisi, 108-111.
- 4 — ANTONIO, C.L. CAVALHEIRO (1983) : Aflatoxin and Aflatoxicosis. Zootecnica International. 41-42.
- 5 — ARDA, M. : Mikoloji. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları. 336. Ders Kitabı. 261.



- 6 — CLARKE, E.G.C., CLARKE, MYRA L. (1975) : Aflatoxin. *Veterinary Toxicology*. 375-6.
- 7 — CLEEG, E.G. and BRYSON (1964) : An Outbreak of Porsoning in Store Cattle Atributed to Brozilian Groundnut Meal. *The Veterinary Record*. 992-994.
- 8 — REMİRER, M.A., AKKİLİC, M., ÖZALP, E., KAYMAZ, Ş., DİNÇER, B., İNAN, T. (1975) : Piyasada satılan bazı karma yemlerin ve yem maddelerinin mycofloralarının belirlenmesi ve bunlarla bulunan *Aspergillus* suşlarının Aflatoxin yapabilme yeteneklerinin araştırılması. *A.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*. Cilt: 26, No: 3-4.
- 9 — GIBSON, W.C. (1962) : *Aspergillus Flavus* Toxin (Aflatoxin) in Animal Products. *The Veterinary Record*. 884.
- 10 — HARTLEY, R.D., NESBITT, F. and O'KELLY, J. (1963) : Toxic Metabolites of *Aspergillus Flavus*. *Nature*. 1056-1053.
- 11 — LOSMORE, R.M. and HARDING, 'D.J. (1961) : A Toxic factor in brazilian Groundnut causing liver damage in figs. *The Veterinary Record*. 1362-1364.
- 12 — NABNEY, J. and BURBAGE, M.B. ALLCROFT, R. and LEWIS, G. (1966) : Metabolism of Aflatoxin in sheep. *Work in Progrees*.
- 13 — SARGEANT, K., SHERDAN, A., O'KELLY, J., GARNAGHAM, R.B.A. (1961) : *Nature*. 192.
- 14 — S. JEAN, PURDY and TRUTER, E.V. (1962) : The Weight-Area Relations in Thin Film Chromatography. *Chemistry and Industry*. 507-506.
- 15 — 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 A.O.A.C.* 60(4).
- 16 — TUNCER, N. (1987) Ankara çevresinde üretilen yumurta örneklerinde Aflatoxin Rezidülerinin araştırılması. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 101-116.
- 17 — WINDHOLZ, T.B., FRIED, J.H., SCHWAM, Harvey PATCHEET, A.A. (1963) : Aflatoxins B and G. *Communications to the editor*. 1706-1707.