

KARS YÖRESİNDE YEMLERDE AFLATOKSİN B1 DÜZEYLERİNİN ELISA YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI *

Die mit Hilfe von ELISA-Verfahren durchgeführten Untersuchungen Zur Bestimmung der Menge von Aflatoxin B1 in den Futtermitteln im Kars-Gebiet

Abdullah DOĞAN**

Murat BAYEZİT**

ÖZET

Bu çalışmada Kars yöresinde tüketilen yemlerde alfatoksin kalıntılarının bulunup bulunmadığı ELISA yöntemi ile araştırıldı.

Araştırma materyali olarak toplam 100 adet yem numunesi kullanıldı. Bu yemlerin 40 adedini besi yemi, 20 adedini karma yem, 20 adedini süt yemi ve 20 adedini de ot numunesi oluşturmuştur. Ot, besi yemi, karma yem ve süt yemi Kars'ta satılan yem torbalarından tekniğine uygun, 100 g miktarında naylon poşetler içine alınarak laboratuvara getirildi. Yem numunelerinden 30 g'ı tartılıp, iyice ufalanarak un haline getirildikten sonra bundan alınan 20 g numune metanol, fosfat tampon ve dimetilformamid karışımı ile ekstrakte edildi ve sulandırma solüsyonu ile uygulama hacmine getirildi. Aflatoksin B1'in standartları hazırlanarak yemlere ppb oranlarında katıldı ve yem numuneleri gibi ekstrakte edildi. Daha sonra bu ekstraktlar belirli hacimlerde yüzeyi antikor ile kaplanmış polisitrolperlenlere uygulandı. Yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla konjugat ve substrat ile inkübasyona bırakıldı ve oluşan yeşil rengin yoğunluğu okuyucuda 405 nm dalga boyunda ölçülerek absorbans ve konsantrasyon değerleri tespit edildi. Ölçüm sonucu numunelerin % 30'unda hiç aflatoksine rastlanmazken, numunelerin % 62'sinde 10 ppb'nin altında ve % 8'inde ise 10 ppb ve üzerinde aflatoksin B1 kalıntıları tespit edildi.

Kars yöresinde tüketilen yemlerde aflatoksin kalıntılarının yaygın olduğu, fakat yemlerin büyük bir çoğunluğunun hayvanların sağlığını etkilemeyecek düzeylerde aflatoksin B1 taşıdığı sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Aflatoksin, Yem, Düzeyi, Kars.

ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegen Arbeit wurde beabsichtigt herauszufinden, ob die in Kars verbrauchenen Futtermittel in Aflatoxin B1 enthalten.

In dieser Arbeit wurden 100 Futterproben, die aus 40 Ernährungsfutter, 20 gemischten Futter, 20 Milchfutter und 20 Krautproben bestehen. Die hundert-gramigen Futterproben wurden ins Labor hingebacht und analysiert 30 g von den hundert-gramigen Futterproben wurde, genommen und hinterher gemahlt. Dann wurden 20 g von gemahlten Futterproben in methanol, Phosphatpuffer und metilformamid extrahiert. Der Extrakt wurde in der Verdünnungssolution für die Anwendung angefertigt. Aflatoxin B1 wurde standardisiert, mit Futter gemischt und hinterher extrahiert. Dieser Extrakt wurde dann mit Polysitrolperlen, deren Oberfläche mit bestimmten Volumen von Antikor bedeckt worden sind, in Kontakt gebracht. Hinterher wurden die Polysitrolperlen gewaschen und erst mit Konjugat, danach mit Substrat inkubiert. Die entstandene grüne Färbung wurde als 405 nm gemessen, dann wurde die Werte der Adsorption und der Konsantration festgestellt.

Nach der Messungen wurden beobachtet, dass 30 % von den untersuchten Proben Aflatoxin nicht enthalten. Dabei wurde festgestellt, dass 62 % der analysierten Proben unter 10 ppb und 8 % der untersuchten Proben über 10 ppb Aflatoxin enthalten. Diese Ergebnisse brachten den Beweis, daß sich Aflatoxin B1 in Futtermitteln im Kars-Gebiet verber befinden, aber die Menge von Aflatoxin B1 ist so gering, daß das die Gesundheit der Tiere nicht beeinflusst.

Schlüsselwort: Aflatoxin, Futter, Mengen, Kars.

GİRİŞ

Mikotoksikozis, uzun süreden beri insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiği bilinen mantar toksinlerinin sebep olduğu önemli bir zehirlerdir (1,2). Mikotoksinlerin alınması sonucu çok eskiden beri epidemiy türünde hastalıkların ortaya çıktığı bilinmektedir (3-7). Bunlar içerisinde en eski olanı ve en fazla tanınanı *Claviceps purpurea*'nın besin maddelerinde üremesi neticesinde oluşan toksinlerin sebep

olduğu Ergotizm'dir (8-11). Bu hastalığa önceleri St. Antonius-Feuer adı verilmiştir (10). Gangrenöz ve sinirsel belirtiler diye iki tipte semptomlar göstererek ortaya çıkan bu hastalığa iki çeşit ergot alkaloidleri sebep olmaktadır. Bunlardan liserjik asit türevlerinin halusinojen etkinliği de mevcuttur. Ergot alkaloidlerinden ergokristin ve ergotamin bugün tıpta doğuma yardımcı olmak amacıyla kullanılmaktadır (8).

* Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proj. No 95/3).
** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Bilim Dalı, Kars-Türkiye.

Günümüzde insan ve hayvanlarda zehirlenmelere neden olan veya ilaç olarak kullanılan çok sayıda mikotoksin ve mikotoksin sentezleyen mantar türleri ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarla 300'den fazla mantar türünün yaklaşık 200 çeşit mantar toksini ürettiği tespit edilmiştir (10,19). Bunlar arasında ergot alkaloidleri (Ergotamin, ergokristin, ergosin, ergokriptin, ergokornin vs), aflatoksinler (Aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1 vs), sterigmatosistin, siteroviridin, sitrinin, ochratoksin, zearalenone, trikotesenler (T-2 toksin, neosolaniol, nivalenol, fusarenon vs), roridin, mitotoksin vs. sayılabilir (1,2,12-15).

Bu mikotoksinleri tüketen insan ve hayvanlarda önemli toksikolojik problemlere rastlanılmaktadır (20). Mikotoksinlerin önemlerinden olan sitreoviridin, solunum sisteminde ve kaslarda felçlere neden olup, Doğu Asya'da görülen Kalp-Berberi hastalığından sorumludur (10,13,21). Bazı Penicillium türü mantarlarca sentezlenen Ochratoksin ve Sitrinin, tubuler nekroze sebep olan önemli mikotoksinlerdendir (5,18,22). Çok sayıda mantar türü tarafından oluşturulan zearalenon, insan ve hayvanlarda fusariotoksikozise neden olmasının yanı sıra bunu bir türevi olan zearanol anabolizan amaçla kullanılmaktadır. Fusariotoksikoziste klinik belirtiler olarak gebe hayvanlarda abortus, gonadlarda tümörler, vulvada ödem ve normalin iki ya da üç katı büyüklüğüne ulaşacak tarzda hipertrofi görülür (10,14,16,19,23). Stachybotryotoksikozisde ise hastalık tablosu atlarda kronik şekilde üç fazda ortaya çıkar. İlk faz bir ay sürer ve cilt, dudak ve ağız bölgesinde nekrozlarla kendini gösterir. İkinci faz 5-10 gün sürer ve klinik belirti olarak kan tablosunda bozukluklara rastlanılır. Leukosit ve trombosit sayısında önemli derecelerde azalmalar dikkati çeker. Üçüncü safha ise en fazla altı gün sürer ve kural olarak ölümlerle sonlanır. Vücut ısısı 41 °C'ye kadar yükselmiş olup ishal ve kalp vurumlarında yavaşlama dikkati çeker ve bunları ölüm izler (10,24).

Bugün çok sayıda mikotoksinin insan ve hayvanlar için toksik etkili olduğu tespit edilmiştir (20,21,24-26). Bunlar içerisinde en fazla tanınanı ve üzerinde en fazla araştırma yapılan aflatoksinlerdir. Aspergillus flavus'un üremesi esnasında ortaya çıkan bu toksinin 18 çeşidinin bulunduğu bildirilmiştir (14,18,27). Bunlar içe-

risinde en önemlisi Aflatoksin B1'dir.

Aflatoksinler 1960 yılında ilk aflatoksin zehirlenmesi olan Tukey X disease olarak adlandırılan civcivlerin toplu ölüm olaylarında hayvanların tükettiği yemlerden izole edilmiştir (10). Daha sonra yapılan çok sayıdaki araştırmalarda aflatoksinlerin zehirlenmelerdeki önemi ortaya konmuştur (14,17,27-29).

Aflatoksinlerin oluşumunda önemli bir yere sahip olan Aspergillus flavus havada, toprakta, canlı veya ölü hayvan ve bitkiler üzerinde hemen her zaman bulunan bir mantardır. Depolanmış tahılların ve diğer birçok tarım ürünlerinin çürümesinden sorumlu bir ajandır. Üremesi için uygun ekolojik şartların bulunması zorunludur. Besi yerinin birleşimi mantarın gelişimini doğrudan etkiler. Mantarlar karbonhidratları ve özellikle de şekerleri severler. Ortamda sakkarozun bulunması ile aflatoksin teşekkülü arasında doğru bir orantı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada besi yerine % 3.5 oranında sakkarozun katılması aflatoksin oluşumunu hızlandırdığı hatta bu yoğunluğun % 8'e çıkarılması aflatoksin teşekkülünü daha da artırdığı belirlenmiştir (12,30). Protein içeriği yüksek olan baklagillere nazaran karbonhidrat içeriği fazla olan tahıllarda aflatoksin oluşumu daha fazladır. Meyveler de sık sık aflatoksinlerle kolayca kontamine olurlar. Toksin üretiminde etkili olan diğer faktörler ortamın pH'sı, ısı, nem ve oksijen yoğunluğudur. Yapılan çalışmalarda aspergillus parasiticus'un besi yerlerinde en iyi pH 10.5'de ürettiği tespit edilmiştir. Toksin üremesi için en uygun pH 8.5'tir. Isı mantarların üremesinde etkili olmakla beraber mantar türlerinin üreme yeteneklerine göre önemli derecede değişiklikler arz etmektedir (12,30). Aflatoksin oluşması için gerekli optimum ısı derecesi 25-30 °C civarındadır. Nem oranının yüksek olması hem mantar üremesini hem de mikotoksin oluşmasını teşvik eder. Nem oranının % 80-90 civarında olması mikotoksin oluşumunu oldukça hızlandırmaktadır (29,30). Ortamda oksijenin varlığı mikotoksin oluşumunu teşvik etmektedir. Mantarlar çok küçük oksijen yoğunluklarında mikotoksin sentezleyebilirler. Ancak ortamda hiç oksijenin bulunmaması, yalnızca karbondioksit ve azot gazının bulunması mikotoksin teşekkülü için yeterli değildir. Aspergillus versicolor'un sterigmatosistin

oluşabilmesi üzerine yapılan bir çalışmada % 20 oksijen, % 60 azot ve % 20 karbondioksitli ortam ile % 10 oksijen ve % 90 azot ihtiva eden ortamlarda mantar ve toksin üremesi araştırılmıştır. Karbondioksit bulunan ortamda hem mantar üremesi hem de mikotoksin tespit edilmesine rağmen yalnızca oksijen ve azot bulunan ortamda mantar üremesi gözlenmesine karşın toksinin oluşmadığı tespit edilmiştir (12,30).

Yem örneklerinde aflatoksinlerin bulunup bulunmadığı laboratuvar analizleri ile ortaya konmasına rağmen mantarların ürediği yemlerde gözlenebilecek bazı değişiklikler mikotoksinlerin yemlerde bulunabileceği şüphesini verebilir (10,17,30-32). Bunlar, yemlerin kokması, renklenmesi, yüksek oranda nemli olması, birbirine yapışık yuvarlak topaklar halinde bulunması ve yemlerde insektlerin görülmesidir (30). Yemlerin aflatoksinlerle kontamine olması, aflatoksinlerin dış şartlara karşı dayanıklı olması dolayısıyla uzun süre bekletilseler dahi tüketiciler için her zaman tehlike arzederler (14,17,23,29).

Aflatoksinler renksiz veya sarı renkte, suda az çözünen buna karşın etanol ve kloroform gibi çözücülerde kolay çözünen ısıya dayanıklı kimyasal bileşiklerdir. 300 °C'nin altındaki ısılarda parçalanmadıkları halde güneş ışığına karşı oldukça hassastırlar ve kolay parçalanırlar (11,14,25,28,33).

Aflatoksinler sindirim kanalından kolayca emilerek kan dolaşımına geçerler. Karaciğerde metabolize edildikten sonra ilk 24 saat içerisinde % 85-90'ı idrar ve süt ile organizmayı terk eder. Alınmalarından 6-9 gün sonra ise vücuttan tamamen atılırlar (27,34-37).

Aflatoksin B1 organizmada demetilasyon ile aflatoksin P1'e, hidroksilasyonla Aflatoksin Q1'e ve Aflatoksin M1'e, hemiasetat konjugasyonu ile Aflatoksin 2a'ya, siklopentan halkasının redüksiyonu ile Aflatoksikole (Aflatoksin Ro) ve epoksit teşekkülü ile Aflatoksin B1-8,9-epoksit'e dönüşür. Tümöral etkisinden Aflatoksinin epoksit türevinin sorumlu olduğu kabul edilir. Bu türev genetik yapılara karşı yüksek derecede affinite göstererek DNA'yı bağlar ve 2,3-dihidro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-Aflatoksin B1 oluşturur (14,28).

Hayvan türleri aflatoksinlere karşı yaş, seks, tür, beslenme şartları, doz, sıcaklık ve besin maddesinin türüne göre farklı duyarlılık gösterirler. Ancak hayvanlarda zehirlenmelere neden total aflatoksin miktarı 10-100 ppm arasında değişmektedir. Aflatoksinlerin LD50 değerleri sıçanlarda 7 mg/kg, kobaylarda 1,4 mg/kg, piliçlerde 6,5 mg/kg ve buzağılarda 1,8 mg/kg'dır. Gökkuşuğu alabalığında her gün verilen 4-8 ppb 12 ayda, 0,8 ppb ise 20 ayda tümörlerin oluşmasına neden olmaktadır (11,14).

Akut aflatoksin zehirlenmelerinde karaciğer hasarına bağlı olarak yaygın sarılık ve kanamalar dikkati çeker. Karaciğerde nekroz odakları ve yağ birikmelerine rastlanır. Kronik olaylarda ise büyüme hızında ve yemden yararlanmada önemli ölçülerde düşme, karaciğerde bozukluk, immun cevapta ve böbrek fonksiyonlarında bozulmalar görülür. Strese uyum yeteneği azalır. Kanatlılarda yumurta verimi ve kuluçkadan canlı civciv çıkma oranı düşer (11,14,22,23,25).

Aflatoksikozisin teşhisi şüpheli materyallerden (yem, yumurta) aflatoksin kalıntılarının laboratuvar çalışmaları ile ortaya konmasıyla yapılır. Bu amaçla çok sayıda yöntemlerden faydalanılmaktadır (2,17,31,32).

Kars yöresinde hayvancılığın ekonomide önemli bir yeri vardır. İnsanlar geçimini hayvancılıkla sağlamaktadırlar. Kış aylarının yörede uzun sürmesi (5-7 ay) nedeniyle hayvan beslemede kullanılan yemlerin kalitesi verimliliği doğrudan etkiler. Kış aylarında hayvan beslemede kullanılan ot yığınları ve diğer yemlerin verimliliği etkileyen mikotoksinler yönünden araştırılması, bu yönde yapılabilecek girişimlerin temelini oluşturur.

Bu çalışmada, Kars yöresinde tüketilen yemlerde Aflatoksin B1 kalıntılarının bulunup bulunmadığının ELISA yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada materyal olarak toplam 100 adet yem numunesi kullanıldı. Numunelerin 40 adedini besi yemi, 20 adedini karma yem 20 adedini süt yemi ve 20 adedini ise ot oluşturdu. Numuneler piyasadan rastgele

teknikğine uygun olarak toplandı. Ot numuneleri yığının kesim yüzeyinden tüketime hazır olanından alınarak laboratuvara analiz edilmek üzere getirildi.

Araç ve Gereçler: Bu çalışmada, mikropipet, polisitrolperlen (pleyt), mikser, karıştırıcı ve ELİSA okuyucusu (Metertech-960) ile diğer rutin laboratuvar sarf malzemeleri kullanıldı.

Solüsyonların hazırlanması

- **ABTS (2,2'-Azino-di(3-etilbenzotiyazolinsulfonat-6) (Merck) stok solüsyonu:** 0.1 g ABTS 5 ml'lik suda çözdürüldü ve 1'er ml'lik hacimler halinde -20 °C'de kullanım için bekletildi.

- **ABTS Kullanma Solüsyonu:** 9.8 ml sitrat tampon, 0.1 ml 0.12 mol/l'lik hidrojen peroksit ve 0.1 ml ABTS stok solüsyonu iyice karıştırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

- **Hidrojene Peroksit (Merck) Solüsyonu:** 0.12 mol/l olacak şekilde hazırlandı. Bu amaç için 0.15 ml % 30'luk hidrojene peroksit 9.85 ml distile su ile sulandırıldı. Günlük hazırlandı.

- **Reaksiyon Durdurma Solüsyonu:** 25 ml % 98-100'lük sülfürik asitten (Merck) alınıp hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

- **Sitrat Tampon Solüsyonu:** (0.05 mol/l, pH 4) 4.8 g sitrik asit monohidrat (Merck) 450 ml distile suda çözdürüldü. Yaklaşık 20 ml 1 mol/l Na-karbonat ile pH 4.0'a ayarlandı. Sonra hacmi 500 ml'ye su ile tamamlandı. 6 °C'de saklandı.

- **Sodyum Karbonat Solüsyonu:** 10.6 g Na-karbonat (Merck) 100 ml suda çözdürüldü.

- **Fötal Dana Serum (FCS) Taşıyan (%3) Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS):** 9 ml fötal dana serumu (Sigma) alındı ve hacmi PBS solüsyonu ile 300 ml'ye tamamlandı.

- **% 1'lik PCS Taşıyan PBS:** 15 ml fötal dana serumu alınıp hacmi PBS ile 1.5 l'ye tamamlandı.

- **Bikarbonat Tampon (0.1 mol/l, pH 9.6) Solüsyon A:** 10.6 g Na-karbonat 1 litre suda çözdürüldü. **Solüsyon B:** 8.4 g Na-hidrojen karbonat (Merck) 1 litre suda çözdürüldü. Solüsyon B solüsyon A ile pH 9.6'ya ayarlandı.

- **Ekstraksiyon Solüsyonu:** 70 ml metanol (Merck), 29 ml PBS ve 1 ml Dimetilformamid (Sigma) karıştırıldı ve dört numunenin ekstraksiyonunda kullanıldı.

- **Ekstrakt Sulandırma Solüsyonu:** 7 ml metanol, 92 ml PBS ve 1 ml dimetilformamid karıştırılarak hazırlandı.

- **Fosfat Tampon Solüsyonu:** (PBS, 0.01 mol/l, 0.15 mol/l NaCl, pH 7.4), 0.27 g potasyum dihidrojenfosfat (Merck), 1.43 g disodyum dihidrojenfosfat (Merck) ve 8.55 g NaCl (Merck) 1 litre suda çözdürülerek hazırlandı.

- **PBS-Twen-Yıkama Solüsyonu:** (0.1 mol/l, pH 7.4, 0.05 % Twen), **Solüsyon A:** 0.54 g potasyum dihidrojenfosfat 17.1 g NaCl ve 1 ml Twen 20 (Merck) 2 litre suda çözdürüldü. **Solüsyon B:** 2.86 g diNa-hidrojenfosfat, 17.1 g NaCl ve 1 ml Twen 20 2 litre suda çözdürüldü. Solüsyon B solüsyon A ile pH 7.4'e ayarlandı.

- **Afl. B1 Stok Solüsyonu:** 1 mg Aflatoksin B1 (Aldrich) 10 ml kloroformda (Merck) çözdürülecek hazırlandı (0.1 mg/ml).

- **Afl. B1 Çalışma Solüsyonu:** Afl. B1 stok solüsyonundan 0.1 ml alınıp 10 ml'ye tamamlandı (1 µg/ml). Bu solüsyondan 0, 1, 2, 3, 4, 8 ve 10 µg/kg numune olacak şekilde yemlere katıldı. (Bu deger 1 µg/kg için 0.02 ml/20 g numuneye denk gelir.)

Metot

Bu çalışma Blüthgen und Mitarb (31)'ın bildirdikleri ELISA yöntemine göre yapıldı. Antiserum B1 ve fötal dana serumları ile polisitrolperlenler hazırlandı.

Ekstraksiyon: Standart hazırlanması için güneş ışığına ince serilerek 10 gün bırakılan ve muhtemel aflatoksin kalıntılarını gidermek amacıyla beş kez kloroformla ekstrakte edilip kurutulan yem numunelerine sırasıyla 0, 1, 2, 4, 8, 10 ppb'lik konsantrasyonlarda aflatoksin çalışma solüsyonundan ilave edildi. Numunelerdeki kloroform buharlaştıktan sonra ekstraksiyon yapıldı. Ekstrakt sulandırma solüsyonu ile ekstrakt 5 ml'ye tamamlandı ve oda ısısında, karanlıkta uygulama için saklandı.

30 g numune iyice ufalandıktan sonra 20 gramı bir behere alındı ve üzerine 100 ml ekstraksiyon solüsyonu ilave edildi. Mikserde 3 dakika karıştırıldı, süzüldü. Bu süzüntüden 0.3 ml alınıp hacmi ekstrakt sulandırma solüsyonu ile 15 ml'ye tamamlandı.

Uygulama: 15 ml hacime getirilmiş standart ya da numune ekstraktı plak kuyularına (2) verildi. Plaklar bir kap içerisinde ışıktan korunarak oda ısısında bir saat süreyle makinede karıştırıldı. Solüsyon pipetle alınarak atıldı ve perlenler bir kez PBS-Twen-Yıkama Solüsyonu ile yıkandı. Konjugat her kuyuya pipetlendi. Plaklar ışıktan korunarak 1 saat oda ısısında karıştırılmadan saklandı. Konjugat pipetle emilerek atıldı ve plak kuyuları üç kez PBS-Twen-Yıkama Solüsyonu ile yıkandı. Sonra Kromojen substrat Solüsyonu (ABTS kullanma solüsyonu) ile plaklar inkübe edildi.

Fotometrik ölçüm: 405 nm dalga boyunda absorbans ve konsantrasyon değeri ölçülerek makineden sonuçlar alındı.

BULGULAR

ELISA okuyucusunda elde edilen absorbans değerleri logaritmik linear eğriye taşınarak sonuçların konsantrasyon değeri ile aynı olup olmadığını kontrolü yapıldı. Cihazdan elde edilen konsantrasyon değerlerinin dökümleri alındı. Her numune iki kuyucuğa konarak konsantrasyon değerlerinin birbiri ile hem kontrolü yapıldı hem de cihazın okuma doğruluğu kontrol edildi.

Numunelerin ortalama olarak taşıdıkları aflatoksin miktarları ve bunların bireysel olarak yem cinsine göre sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmiştir.

Aflatoksin B1 tespit edilen numunelerin yemlere göre yüzde oranları Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2'de görüldüğü gibi analiz edilen toplan 100 numunenin % 30'unda hiç aflatoksin B1 kalıntısına rastlanmazken, % 62'sinde 10 ppb'den az ve yine %8'inde 10 ppb ve üzerinde aflatoksin kalıntısı tespit edilmiştir.

Tablo 1. Yem cinsine (sığır) göre ortalama aflatoksin B1 düzeyleri (ppb).

Tabella 1. Durchschnittliches Niveav von Aflatoxin B1 (ppb) im Futter in Abhängigkeit von den Unterschiedlichen Futtermittel beim Rind.

Numune No	Besi Yemi	Karma Yem	Süt Yemi	Ot
1	8.8	7.3	8.6	6.6
2	8.4	7.6	8.3	8.2
3	8.3	9.0	8.3	5.3
4	8.7	8.9	8.6	9.1
5	9.2	9.1	8.9	5.2
6	9.4	x	9.2	9.1
7	9.8	0	7.6	1
8	7.6	0	x	0
9	8.0	0	4.4	0
10	9.0	1.6	x	0
11	6.8	7.2	0	0
12	8.0	7.8	0	0
13	8.4	8.7	0	0
14	8.5	0	0	0
15	7.7	0	6.3	8.7
16	9.1	8.6	0	8.0
17	8.9	0.7	0	4.4
18	9.5	x	0	7.4
19	5.8	x	4.9	8.3
20	7.9	x	0	7.2
21	8.6			
22	7.6			
23	9.2			
24	8.8			
25	8.3			
26	6.2			
27	8.6			
28	9.4			
29	x			
30	x			
31	0...			

..: Numune sayısının 40'a kadar devam ettiğini,
...: Bundan sonra devam eden numunelerde aflatoksin kalıntılarının bulunmadığını,
x: Kalıntı miktarının 10 ppb ve üzerinde olduğunu gösterir.

Tablo 2. Yem çeşidine göre aflatoksin B1'in oranları (%).**Tabella 2.** Das Aflatoxin B1 - Niveav in Abhängigkeit von der verschiedenen Futtersorte

Aflatoksin Düzeyi (ppb)	Besi Yemi	Besi Yemi	Besi Yemi	Ot	Toplam
0	%25	%25	%40	%35	%30
10 ppb'den az	%70	%55	%50	%65	%62
10 ppb ve üstü	%55	%20	%10	%10	%8

TARTIŞMA ve SONUÇ

Aflatoksinler, yem ve diğer besin maddeleri üzerinde kendilerinin üreyebilmesi için uygun şartlar bulunduğunda hızla üreyerek mikotoksin adı verilen metabolitlerin oluşmasına neden olan çok önemli mantar toksinleridir. Aflatoksinlerin çok sayıda metabolitlerinin arasında en tehlikelisi, en fazla görüleni ve dolayısıyla üzerinde en fazla çalışılan aflatoksin B1'dir. Aspergillus flavusun ana metaboliti olması dolayısıyla aflatoksin B1'in tespit edildiği numunelerde diğer aflatoksinlerin bulunmasının şart olmadığı, ancak diğer aflatoksin bulunan numunelerde mutlaka aflatoksin B1'in bulunacağı bildirilmiştir. Bu sebeple yemlerde aflatoksin B1'in bulunması aflatoksinler için çok önemli bir kriterdir (1). Toksik etkilerinin yüksek olması veteriner hekimlikte aflatoksinlere karşı ekonomik öneme sahip civcivlerin ve diğer kanatlıların oldukça duyarlı olması aflatoksinlerin hayvan yemlerinde belirli düzeylerin altında bulunması veya bu değerlerin bilinerek gerekli görülen tedbirlerin alınması oldukça büyük bir önem taşır (22,23). Bu çalışmanın amacı da bu yöne hizmet etmektedir.

Aflatoksinlerin yem ve diğer materyallerden analiz edilmesi ile ilgili olarak çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında biyolojik araştırma metotları, ince tabaka kromatografisi, yüksek performanslı likit kromatografisi, gaz sıvı kromatografisi ve immunokimyasal araştırma metotları sayılabilir. Bu yöntemlerin duyarlılığı ekstrakte edilen numunenin türüne göre farklılıklar gösterse bile, amaç itibarıyla aynı sonuca hizmet etmektedir (2,17,28,31,34).

Biyolojik araştırma metotları canlı materyaller üzerinde yapılmaktadır. Hayvanlara yedirilen şüpheli numunelerde mikotoksinlerin belirli düzeylerin üzerinde bulunması ölüme neden olmaktadır. Bir çok toksik maddenin deney hay-

vanlarında aynı sonuca neden olabileceğinden dolayı bu metot kesin teşhis için yeterli değildir. Bu amaç için en fazla kullanılan test materyallerinin başında bitkiler, bakteriler, protozoonlar, tavuk embriyosu ve rat karaciğeri ve böbreği gelir. Aflatoksin B1'e Bacillus spp. duyarlılığı 0.05 mikrogram/ml, tavuk embriyosunun 0.05 mikrogram/yumurta'dır. İnce tabaka kromatografisi 0.05-1 ppb, HPLC 0.1-1 ppb, immunolojik araştırma metotlarından radioimmunoassay 0.8-6 ppb ve son yıllarda üzerinde çalışılan ELISA 1 ppb yoğunluğunda aflatoksin B1'in analiz edilmesine olanak tanımaktadır (2).

Ülkemizde aflatoksinlerin analizinde en fazla ince tabaka kromatografisi kullanılmaktadır (17,23,29). Yapılan literatür taramalarında ülkemizde ELISA yöntemi ile sütlerde aflatoksin M1 analizine rastlandığı halde aflatoksin B1 analizinin yapıldığı saptanamamıştır (34). Bu çalışma bu yöntemin ülkemizde de aflatoksin analizinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Aflatoksinin ELISA ile ispatı tekrarlılığı, geri alınım oranı, pratikliği, doğruluğu, zaman tasarrufu, spesifikliğı ve gelişim potansiyelleri gibi önemli avantajlar sağlar. Yöntemin duyarlılığı oldukça yüksektir. Yem numunelerinden 1 ppb oranında aflatoksin B1 kalıntılarının tanınmasına olanak verir. Ancak optimum absorbanı 405 nm dalga boyunda 0-10 ppb'lik yoğunluklar arasında linear eğri vermektedir (9,31). Bu yüzden bu çalışmada 10 ppb ve yukarısı şeklinde bir sınıflandırılmaya gidilmiştir.

Aflatoksinlerin toksik etkileri nedeniyle yemlerde bulunan miktarlarına birçok ülkelerde bazı sınırlandırmalar getirilmiştir. Bu sınır değerleri üzerinde aflatoksin ihtiva eden yem ve diğer besin maddelerinin hayvan ve insanlar

tarafından tüketilmesine izin verilmediği gibi bu ülkelere girişleri de yasaklanmıştır. Ülkemizde süt ürünlerinde aflatoksin B1 ve M1'in 0.5 ppb, gıda maddeleri ve tarım ürünlerinde toplam aflatoksin kalıntılarının 20 ppb, çocuk mamalarında 2 ppb, karma yemlerde 50 ppb'den daha yüksek miktarlarda bulunmasına izin verilmez. Diğer bazı ülkelerde aflatoksinlerin tolerans düzeyleri ise şöyledir: Belçika'da karma yemlerde 40 ppb, Kanada'da insan besini olarak kullanılan maddeler için 5 ppb, hayvansal yemlerde 100 ppb, Fransa'da yem hammaddeleri için 700 ppb, İtalya'da insan ve hayvan besini olarak hazırlanan besinlerde 50 ppb, ABD'de her çeşit hayvan yeminde 20 ppb'dir. Bu ülkede insan besini olarak tüketilen yemlerde aflatoksin kalıntılarının bulunmasına izin verilmez (17,33,36,37).

Bu yöntem süt ve süt ürünlerinde, çocuk mamalarında ve doku, organ kalıntıları ile deneysel çalışmalarda aflatoksin kalıntılarının ölçülmesinde sınırlamalar dahilinde kesin sonuçlara varılacağı için kullanılabilir (28,34). Yemlerde 0-10 ppb'lik konsantrasyonların üzerinde aflatoksin B1 düzeylerine sınırlandırma getirildiği için bu metot ile hiç aflatoksin tespit edilemeyenn ve 10 ppb'nin altında aflatoksin B1 tespit edilen yem numunelerinin tüketimine izin verilebileceği halde 10 ppb ve üzeri için kesin bir değer söylemesine imkan tanımamaktadır. Dolayısıyla bu ölçümler için yöntemin geliştirilmesi gereklidir.

Yurtdışında ve ülkemizde yemlerdeki aflatoksin kalıntıları üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Almanya'da Hannover'de 1980-1984 yılları arasında analiz edilen toplam 1469 örneğinden % 18.3'de mantar sporlarına rastlanmıştır. 1982 yılında Almanya'da araştırılan yem örneklerinin % 10.2'sinde aflatoksin B1 kalıntıları tespit edilmiştir. ABD'de yapılan bir çalışmada 1976-1980 yılları arasında 536 mısır numunesinden 245'nin 1000 ppb'ye kadar aflatoksin B1 kalıntılarının tespit edildiği bildirilmiştir. Yine aynı ülkede 1964-1972 yılları arasında hasat edilen 1938 mısır numunesinin 117'sinde değişik düzeylerde aflatoksin B1 tespit edilmiştir (14).

Kaya ve ark (23) yağlı tohum küspelerinde yaptıkları bir çalışmada mikotoksin rastlanma oranının % 15 dolayında olduğunu tespit etmiş-

lerdir. Yine aynı araştırmacılar hayvanlarda gelişme geriliği, verim azalması, yemden yararlanmanın düşmesi ve ölümlere sebep olması şüpheleriyle analizi istenen yem ve yem hammaddelerinde yapılan analizler sonucunda hayvanlarda akut bir zehirlenmeye neden olmayacak düzeylerde yaygın bir aflatoksin kalıntısının bulunduğunu bildirmişlerdir. Analiz edilen 270 yem ve yem hammaddesinin 100'ünde 0.1-80 ppb arasında aflatoksin B1 kalıntısı tespit edilmiştir. Bu çalışmada analiz edilen toplam 100 adet yem numunesinin % 8'inde 10 ppb ve üzerinde aflatoksin B1 kalıntısına rastlanmıştır. 0-10 ppb yoğunluğunda aflatoksin taşıyan numunelerin ise oranı % 62'dir. Bu sonuçlar diğer araştırmalarda olduğu gibi yemlerin yüksek oranda aflatoksin ile kontamine olduklarının bir göstergesidir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre tespit edilen değerlerin % 92'sinin hayvanlar tarafından tüketilmesinin herhangi bir zararı yoktur. % 8'i için aynı sonuçları söylemek mümkün değildir. Akut ve subakut zehirlenmelere yol açmayacak düzeylerdeki (200 ppb'nin altında) aflatoksin kalıntıları taşıyan yemleri tüketen hayvanlarda, özellikle kanatlılarda bazı biyokimyasal değişikliklere rastlanmaktadır. Pıhtılaşma proteinlerinin sentezinin bozulması ve bağışıklık sisteminin deprese edilmesi gibi bir takım bozukluklara sebep olabilir. Bağışıklık sisteminin zayıflaması hastalıklara kolay yakalanma riskini yükselterek işletmelerde büyük oranlarda zararların ortaya çıkmasına sebep olur.

Yapılan analizler sonucunda 3 numune hariç diğerleri için taşıdıkları aflatoksin kalıntılarının tüketilmesi hayvanlarda her hangi bir bozukluğu sebep olmayacağı söylenebilir. Ancak aflatoksin kalıntılarının yemlerde bulunan diğer mikotoksinlerle veya diğer bir takım olumsuzluk faktörleri ile sinerjik etkileşimlere girerek zararlı etkilerin ortaya çıkmasında rol oynayabileceği hatırdan çıkarılmamalıdır (36). Ayrıca yemlerde bulunabilecek çok küçük miktarlardaki aflatoksin kalıntıları hayvanların süt, et ve yumurta gibi ürünlerine geçerek tüketicilerin sağlığını tehlikeye düşürebilecek bozulmalara ulaşabilir (35).

Sonuç olarak analiz edilen yem numunelerinin taşıdığı (10 ppb ve üzeri hariç)

aflatoksin B1 miktarlarının hayvanların sağlığını ve verimini olumsuz yönde etkilemeyeceği söylenebilir. 10 ppb ve üzerinde aflatoksin B1 tespit edilen numuneler için ise kesin sonuç ancak diğer yöntemler ile aflatoksin B1 miktarları belirlendikten sonra söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Anonim: The Threat of Aflatoxins. JAVMA, 194(6): 743-746, 1989.
2. Mauer J and Gareis M: Untersuchungsmethoden für Mykotoxine. Deutsch Tierärztl Wschr, 96, 346-349, 1989.
3. Pittet A: Natural Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds-an Updated Review. Revue de Médecine Veterinaire. 149(6): 476-492, 1998.
4. Bars JLE and Bars PLE: Strategy for Safe Use of Fungi and Fungal Derivatives in Food Processing. Revue de Médecine Veterinaire, 149(6): 493-500, 1998.
5. Carlton WW, Tuite J and Caldwell R: Penicillium Viridicatum Toxins and Mold Nephrosis. JAVMA 163(11): 1297-1299, 1973.
6. Smalley EB: T-2 Toxin, JAVMA, 163(11): 1278-1280, 1973.
7. Tapia MO and Seawright AA: Experimental Ochratoxycosis A in Pigs. Aust Vet J, 61(7): 219-222, 1984.
8. Burfening PJ: Ergotism, JAVMA, 163(11): 1288-1290, 1983.
9. Cysewski SJ: Paspalum Staggers and Tremorgen Intoxication in Animals. JAVMA, 163(11): 1291-1292, 1983.
10. Habermahl G: Die Bedeutung von Mykotoxikosen für Mensch und Tier. Dtsch Tierärztl Wochenschrift, 96, 335-338, 1989.
11. Schuh M: Bedeutung der Mykotoxinaufnahme für Leistung und Gesundheit. Dtsch Tierärztl Wschr, 96, 353-355, 1989.
12. Böhm KH: Entwicklungsbedingungen für Toxinbildende Pilze. Dtsch Tierärztl Wschr, 96, 339-341, 1989.
13. Crump MH: Slaframine (Slobber Factor) Toxicosis. JAVMA, 163(11): 1300-1302, 1973.
14. Kaya S: Yem ve Besinlerdeki Mikotoksinler: İnsan ve Hayvan Sağlığı için Önemleri. AÜ Vet Fak Derg, 36(1): 226-253, 1989.
15. Munro IC, Scott PM, Moodie CA and Willes RF: Ochratoxin A-occurrence and Toxicity. JAVMA, 163(11): 1269-1273, 1973.
16. Blaney BJ, Bloomfield RC and Moore CJ: Zearalenone Intoxication of Pigs. Aust Vet J, 61(1): 24-27, 1984.
17. Kaya S: Süt Yemi ve Çiğ Sütte Aflatoksin Kalıntılarının Kromatografik Yöntem ile Araştırılması. AÜ Vet Fak Derg, 29(3-4): 443-457, 1982.
18. Lillehoj EB: Feed Sources and Conditions Conducive to Production of Aflatoxin, Ochratoxin, Fusarium Toxins and Zearalenone. JAVMA, 163(11): 1281-1283, 1973.
19. Nelson GH, Christensen CM and Mirocha CJ: Fusarium and Estrogenism in Swine. JAVMA, 163(11): 1276-1277, 1973.
20. Richard JL: Mycotoxin Photosensitivity. JAVMA, 163(11): 1298-1299, 1973.
21. Shreeve BJ and Patterson DSP: Mycotoxicosis. The Vet Rec October, 11, 279-280, 1975.
22. Piet AC: An Overview of the Mycotoxicoses of Domestic Animals. JAVMA, 163(11): 1250-1261, 1973.
23. Kaya S, Yavuz H ve Akar F: Bazı Yağlı Tohum Küspelerinde Mikotoksin Kalıntıları. AÜ Vet Fak Derg, 37(1): 173-180, 1990.
24. Wilson BJ, Maronpot RR and Hildebrandt PK: Equine Leukoencephalomalacia. JAVMA, 163(11): 1293-1294, 1973.
25. Shreeve BJ, Paterson SP and Roberts A: Investigation of Suspected Cases of Raycotoxicosis in Farm Animal in Britain. The Veterinary Record. October 11, 275-278, 1975.
26. Wilson BJ and Harbison RD: Rubratoxins. JAVMA, 163(11): 1274-1275, 1973.
27. Madden A and Stahr M: Retention and Distribution of Aflatoxin in Tissue of Chicks Fed Aflatoxin-Contaminated Poultry Rations Amended with Soil. Vet Human Toxicol, 37(1): 24-29, 1995.
28. Fleeschen W and Blütngen A: Bedeutung Einer Mykotoxin für die Kontamination von Milch und Milchprodukten. Dtsch Tierärztl Wschr, 96, 355-360, 1989.
29. Kaya K, Bilgili A ve Çetin İ: Etlik Piliç Yetiştiriciliğinde Altıktan Kaynaklanabilecek Mikotoksin Riskinin Araştırılması. TÜBİTAK VHAG Proje No: VNAG-783, 1990.
30. Thalmann A: Bedingungen für die Bildung von Mykotoxinen in Futtermitteln. Dtsch Tierärztl Wschr, 96, 341-343, 1989.
31. Blütngen A, Schrader W, Aman I, Heeschen W and Hahn G: Zum Enzyimmunologischen Nachweis von Aflatoxin B1 in Futtermitteln für Milchtiere. I. Entwicklung und Bewertung Eines Perlen-ELISA. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte. 42(3): 339-349, 1990.
32. Trucksess MW, Young K, Donahue KF, Morris DK and Lewis E: Comparison of two Immunochemical Methods with Thin-layer Chromatographic Methods for Determination of Aflatoxins. J Assoc Off Anal Chem, 73(3): 425-428, 1990.
33. Müller H-M: Massnahmen zur Minderung von Mykotoxinbildung und -Anreicherung in Futtermitteln. Dtsch Tierärztl Wschr, 96, 363-368, 1989.
34. Ergün Ö: Sütte ELISA Testi ile Aflatoksin M1 Tesbiti. Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 18(1-2): 60.65, 1987.
35. Fink-Gremmels J: Bedeutung der Mykotoxinaufnahme für das Schlachtvieh. Dtsch Tierärztl Wschr, 96, 360-363, 1989.
36. Steimer J, Blütngen A, Heeschen W, Wetzel S and Hamann J: Untersuchungen zur Beeinflussung der Ausscheidung von Aflatoxin M1 Durchpolychlorierte Biphenyle Beim Lactierende Rind. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte. 42(49): 543-552, 1990.
37. Wessel Jr and Stoloff L: Regulatory Surveillance for Aflatoxin and Other Mycotoxins in Feeds, Meat and Milk. JAVMA, 163(11): 1284-1287, 1973.