



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TİCARİ KEDİ VE KÖPEK MAMALARINDA MİKOTOKSİN, NİTRAT VE NİTRİT ANALİZİ

Ülkü Kamile BECER

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ**

2008- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİCARİ KEDİ VE KÖPEK MAMALARINDA MİKOTOKSİN,
NİTRAT VE NİTRİT ANALİZİ**

Ülkü Kamile BECER

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ I ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ**

2008- ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	
İçindekiler	ii
Önsöz	iii
Şekiller	iv
Çizelgeler	v
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikotoksinler	2
1.2. Nitrat ve Nitritler	7
1.3. Sınır Değerler	14
1.4. Çalışmanın Amacı ve Önemi	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Aflatoksin Analizi	17
2.2. Nitrat ve Nitrit Analizi	21
2.3. İstatistik	28
3. BULGULAR	29
4. TARTIŞMA	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
ÖZET	37
SUMMARY	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	47

ÖNSÖZ

Aflatoksikozisler, çok sayıda araştırmaya rağmen günümüzde hayvanlarda devam eden bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan araştırmalarda yem ve yem hammaddelerinde sürekli mikotoksinlere rastlanmakta ve uygun şartlarda hazırlanmadığında bu türden kirliliklerin sürekli var olmaya devam edeceği bildirilmektedir.

Nitrat- nitritler ise doğal olarak toprak, su, atmosfer, tüm bitki kısımları ve ette bulunmaktadır. Bu kadar yaygın şekilde rastlanmasının sebebi atmosferik azot-toprakta bakteriyel nitrat halinde tutulma, bitki proteinlerine çevrilme, bitki ve hayvansal metabolizma artışı ve atığı olarak atılma, nitrat ve amonyağa çevrilme ve tekrar atmosfere salıverilme aşamalarından oluşan doğal azot dolanımıdır. Nitritler yemlere koruyucu olarak katılırlar. Güçlü oksitleyici maddeler olmaları nedeniyle methemoglobinemiyle seyreden akut zehirlenmelere sebep olurlar.

Bu tez çalışmasında ülkemizde kedi ve köpek beslenmesinde son yıllarda daha çok kullanılmaya başlanılan kuru mamalarının içinde bulunması olası AFB₁, nitrat ve nitrit düzeylerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanlığına, tezimin savunmasında beni değerlendiren TİK Üyelerine, doktora tezimin çalışmaları sırasında değerli zamanını ayırarak temel kavramları anlamam ve uygulamam konusunda her zaman ihtiyaç duyduğum bilgileri bana sunan danışmanım Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ'ye, laboratuvar çalışmalarımda bilgi ve emeğini esirgemeyen Kimyager Süreyya KARAASLAN'a, her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm deneyim ve yardımlarıyla beni yönlendiren tüm Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne, Anabilim Dalı çalışanlarına, doktora başlamanın konusunda beni teşvik eden ve tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini eksik etmeyen annem Rabia ve babam Halil İbrahim BECER'e, kardeşim Abdullah BECER'e, ve sonsuz sabırlarından dolayı tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER

Şekil 2.2.3.1. Kadmiyum indirgeme kolonu	24
Şekil 2.2.5.1. Nitrat ve nitrit standart eğrileri	26
Şekil 3.1. Kedi ve köpek kuru mamalarında bulunan nitrat ve nitrit düzeyleri	30

ÇİZELGELER

Çizelge 1.2.1.	Yemlerde toksik olabilecek nitrat düzeyleri (kuru maddede)	9
Çizelge 1.3.1.	Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğe göre yemlerde bulunmasına izin verilen yüksek nitrit ve AFB1 miktarı	15
Çizelge 2.1.5.1.	İTK plakasının incelenmesi ve değerlendirilmesi	20
Çizelge 3.1.	Kedi ve köpek kuru mamalarında bulunan nitrat ve nitrit düzeyleri, en alt ve en üst değerleri	29
Çizelge 3. 2.	Kedi kuru mamalarında belirlenen nitrat ve nitrit miktarlarının sayıca bulunma sıklığının değerlendirilmesi	30
Çizelge 3. 3.	Köpek kuru mamalarında belirlenen nitrat ve nitrit miktarlarının sayıca bulunma sıklığının değerlendirilmesi	31

1. GİRİŞ

Ev ve süs hayvanı olarak en fazla tercih edilen hayvanlar arasında kedi ve köpeklerin yer aldığı, ancak bunlara gereksinimlerini karşılayacak uygun besin maddelerinin her zaman verilemediği bilinmektedir. Her canlıda olduğu gibi kedi ve köpeklerin de temel bir enerji gereksinimi vardır. Doğaları gereği etobur olan kedi ve köpeklerin beslenmesindeki bilgiler uzun süre yetersiz kalmıştır. Buna rağmen pişmiş tahıl, sebze v.b. etsiz besinlerin de gıdalarının bir parçası haline getirilmesinde başarılı olunmuştur. Besin maddelerinin teknolojik yönden geliştirilmesiyle kedi ve köpekler için özel hazır mamalar üretilmiştir. Günümüzde endüstriyel anlamdaki gelişmelerle beraber yeterli ve uygun hale gelmiş olan hazır mamalar bir sektör haline gelmiş, çeşitlilik, kalite ve içerik açısından farklılaşmaları da sağlamıştır. Bu çeşitlilik içerisinde kalitenin belirlenmesi ihtiyacı söz konusudur. Hazır mamaların içerdiği besin maddelerinin saptanmasının yanı sıra hijyenik kalitesi de iyi olmalıdır. Bu nedenle her türlü yem maddesinin bilimsel ölçüler ve kurallar içinde üretilmesi, taşınması, saklanması ve yedirilmesi gereklidir (Özpınar, 1995).

Türkiye’ de, son yıllarda, veteriner hekimliğin sorumluluğu alanına, kedi ve köpeklerin bakım ve tedavisi yanında, bilinçli, sağlıklı bir biçimde beslenebilmeleri açısından üretilen, ayrıca ithal edilen kuru mamaların kullanımı da girmiştir. Ekonomik değeri nedeniyle inek, koyun, tavuk, hindi, ördek gibi canlıların yemlerindeki toksik maddelerle ilgili birçok araştırmaya rastlanırken, insani amaçlarla günlük ev hayatında beslenen kedi ve köpeklerin hazır kuru mamalarındaki olumsuzluk faktörleri ile ilgili çalışmalar az miktardadır.

Yaşamın temelini teşkil eden beslenme ihtiyacı karşılanırken gıda maddelerinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik yönden güvenilir nitelikte olması gerekir. Yem ve gıda hijyeni, yem ve gıdanın üretimi, depolanması ve tüketiminin sağlığa uygun koşullarda yapılması olarak tanımlanmaktadır. Hijyenik koşullarda gerçekleştirilen üretim sonunda yem ve gıda maddelerinin raf ömürlerinin uzatılacağı, sağlıkla ilgili risklerin oluşmayacağı ve yem ve gıda işletmelerinin veriminin artacağı ileri sürülmektedir. Aksi takdirde, yem ve gıda kaynaklı mikrobiyal bozulma sonucu oluşacak enfeksiyon ve zehirlenmelerin, sağlığı olumsuz yönde etkileyerek aynı

zamanda ekonomik kayıplara yol açacağı bildirilmektedir (Aran, 1993; Dinçer, 1995).

Yemlerin değerlendirilmesi ve kontrolünde duyuşal, kimyasal, mikrobiyolojik, biyolojik, mikroskopik yöntemler kullanılır. Organoleptik yöntemler ise yemlerin renk, dokunma, yabancı maddeler, koku ve görünüş bakımından incelenmesi konusuyula ilgilenir (Akkılıç ve ark., 1979; Akyıldız, 1968). Yem kalitesinin belirlenmesinde sadece içerdikleri besin maddelerinin miktarının saptanması yeterli değildir. Aynı zamanda mikrobiyolojik ve kimyasal bulaşma olasılıklarının da değerlendirilmesi gerekir (Bhat ve ark., 2003).

1.1 . Mikotoksinler

Mikotoksinler, küfler tarafından oluşturulan ikincil toksik bileşiklere verilen genel isimdir. Mikotoksinler, gıda ve yemlerde bulunan kimyasal etkenler içerisinde insan ve hayvan sağılığını tehdit eden en ciddi tehlikelerden biridir.

Hayvan yemi ve insan gıdası olarak üretilen bitkisel ürünlerin üretimi, hasadı, işlenmesi ve depolanması sırasında şekillenebilen mikotoksinler, yem ve besin maddelerinde fark edilebilir bir küflenme olmadığında bile tehlikeli düzeyde bulunabilirler. Mantarlar öldükten sonra da yem ve besinlerde uzun süre kalabilirler. Mikotoksinlerle bulaşmış yemlerle beslenen evcil hayvanlarda meydana getirdikleri karmaşık nitelikli karaciğer, böbrek, deri, sinir sistemi ve hormonal denge bozukluklarıyla kendini gösteren akut ve kronik zehirlenmeler, verim kaybı, ağırlık artışında azalma ve immunosupresyon gibi etkilerinin yanı sıra; genotoksik etkileri ve aflatoksin, okratoksin ve fumonisin gibi toksinlerin insanlarda çeşitli kanser tiplerinin oluşumunda rol oynaması halk sağılığı açısından önemlidir. İnsan ve hayvanlarda toksik etkiler meydana getiren mikotoksinlerle ilgili olarak yapılmış çalışmaların büyük kısmını aflatoksinler oluşturmaktadır (Fink-Gremmels, 1999; Kaya, 1984b).

Küf üretmesi ve mikotoksin oluşumu, ürünün içeriğı, sıcaklık, nem, havalandırma, insektlerin verdiği zararlar, küfün spor sayısı gibi faktörlerin etkileşimlerine bağılı olarak şekillenebilmektedir. Mikotoksinler çeşit ve miktarına bağılı olarak temas ettikleri gıdaları ve yemleri tüketen insan ve hayvanlarda sağılık problemleri oluşturabilmekte, ayrıca bu ürünlerin ihracatı ve ithalatı olumsuz yönde

etkilendiğinden büyük ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Bu nedenlerle, mikotoksinlerin rutin kontrollerinin yapılması, mikotoksinlerin öneminin ve tanı yöntemlerinin iyi bilinmesi gereklidir (Oruç, 2005).

Mantarların gelişmesi ve mikotoksin üretebilmeleri, sıcaklık, pH değeri, oransal rutubet, oksijen ve karbondioksit düzeyleri, mikroorganizma rekabeti, mekanik hasar, mantarın türü gibi kompleks etkileşim koşullarına bağlıdır. Ayrıca, mantarın gelişmesi gıda ve bileşimine de bağlıdır (Ominsk ve ark., 1994).

Mantarların gelişmesi gıda maddesindeki mevcut elementlerin yoğunluğuna, organik karbon ve enerji kaynaklarına bağımlılık gösterir. Mantarlar, glikoz ve monosakkaritler gibi suda çözünen düşük moleküllü maddeleri kısa sürede tüketirler. Ayrıca K, Ca, Fe, Mg, P, Zn gibi elementlerle, azot kaynağı olarak da pepton, polipeptit, aminoasit gibi organik maddelerden yararlanırlar (Kaya, 2002).

Mantarlar genellikle ortamın nisbi neminin % 50–60, gıdaların nem oranının ≥ 9 olduğu durumlarda kolayca gelişerek mikotoksin sentezleyebilirler. Örneğin *Aspergillus flavus* ve diğer *Aspergillus*lar % 13- 18 rutubet içeren gıdalarda kolayca gelişerek çoğalırlar. Sıcaklık olarak ise mantarlar genellikle 20 – 30 °C 'de gelişirler ve mikotoksin sentezlerler. Mantarların türüne bağlı olarak gelişebilmeleri için gerekli olan uygun sıcaklıklar değişkendir. Örneğin aflatoksin oluşturan mantarlar 10 – 45 °C arasında gelişirken, okratoksin A sentezleyen mantarlar 30 °C de kolayca gelişebilmektedirler (Marquardt ve ark., 1992).

Küflenme sonucu kirlenmiş besinleri tüketen insan ve hayvanlarda gelişen zehirlenme olguları mikotoksikozis olarak adlandırılır. Mikotoksinler canlı vücuduna büyük çoğunlukla sindirim sisteminden alınır ve düşük miktarlarda bile hastalıklara veya ölümlere yol açabilirler. Mikotoksikozis adı verilen mikotoksin zehirlenmelerinin insan ve hayvanlarda mikotoksin çeşidine, miktarına, hayvanın türüne, duyarlılık derecesine ve maruziyet süresine göre latent, akut, subakut ve kronik karakterde olabileceği gibi, kromozomlar üzerinde mutajenik etkilerinin görülmesinden dolayı daha sonraki kuşaklara taşınabilecek kalıcı bozukluklara da yol açabilecekleri görülmektedir (House, 1990).

Mikotoksin çeşitlerinin yaygınlık bölgeleri farklı olmakla beraber pek çok ülkede yem hammaddelerinin büyük bir kısmının ithal ürünlerden sağlanması risk boyutunu arttırmaktadır. Avrupa'da düzenli olarak yapılan kontroller nedeniyle Avrupa'dan

Türkiye'ye ithal edilen yem ve yem hammaddelerindeki bulaşmadan kaynaklanan tehlikeler büyük oranda engellenmiştir (Fink-Gremmels, 1999).

Mikotoksinlerin yemle birlikte alım süreci ve alınan mikotoksin miktarı değerlendirildiğinde, canlılarda çeşitli etkilerinin görülebileceği ve bu nedenle en güvenli tolerans düzeyinin sıfır olması gerektiği kabul edilir. Fakat günümüzde mikotoksinlerin çeşitli ürünlerde doğal olarak yaygın bir şekilde bulunması nedeniyle bu düzeyin uygulanması mümkün olmayacağı için maksimum tolerans düzeyleri kullanılmaktadır.

Önceleri besin maddelerinin estetik olarak bozulması şeklinde değerlendirilen bu sorun 1960'da İngiltere'de 100.000'den fazla hindinin toplu ölümüyle daha çok bir zehirlenme kaynağı olarak dikkat çekmiştir. İngiltere'de Tarımsal Bilim ve Teknoloji Konseyine ve bu konuda araştırma yapan bilim adamlarına göre, dünya besin ürünlerinin yılda en az % 25'inin mikotoksinler tarafından etkilendiği (House, 1990) ve yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1.4 milyar dolardan daha fazla ekonomik kayba yol açtığı bildirilmiştir (Anonim, 2003; Taylor, 2001).

Bugün bilinen 300'den fazla mikotoksin olmasına rağmen, bunlardan beş veya altı tanesi çok önemlidir. Önem derecesine göre sıralama ülke ve bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte aflatoksinler, okratoksin A (OTA), fumonisinler, trikotesenler ve zearalenonun birinci derecede önemli mikotoksinler olduğu konusunda araştırmacılar görüş birliğindedirler (Anklam ve ark., 2002; Park, 2002).

Mikotoksinler arasında üzerinde en çok çalışılanı ve en ilgi çekeni aflatoksinlerdir (Bhat ve ark., 2003). Aflatoksinler hemen hemen tüm hayvan türleri ve insanlar için zehirli olmaları, ayırım gözetmeksizin her çeşit yem ve gıda maddesinde yaygın kirlenmeye yol açmaları, potansiyel karsinojen olmaları, küflü rasyonla beslenen hayvanların ürünlerinde kalıntılarına rastlanması nedeniyle yoğun biçimde araştırılmaktadır (Kaya, 2002).

Aflatoksinler (AF'ler) *Aspergillus* türü bazı mantarların ürettikleri son derece zehirli toksinleridir. Yemlerde, yem hammaddelerinde ve işlenmiş veya işlenmemiş gıdalarda bulunabilirler (Anonim, 1979). İnsan, sığır, köpek, kedi, domuz, kanatlılar ve deney hayvanlarında hepatik sendrom, karaciğer kanseri, hemoraji, yemden yararlanma ve büyüme hızında yavaşlamaya yol açarlar (Şanlı, 1995).

Aflatoksinler yapısal yönden birbirlerine çok benzeyen furanokumarin türevidir. Genellikle aflatoksin terimi doğal ortamda en fazla bulunan ve en sık karşılaşılan türevler olan aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂' yi karşılar. Bunların içerisinde en fazla sentezlenen ve dolayısıyla besinlerde en yoğun bulunan türev aflatoksin B₁' dir. Diğer türevlerinin yoğunluğu G₁, B₂ ve G₂ sırasını izleyerek azalır (Şanlı ve ark., 1982a).

Aflatoksinlerin insan, hayvan ve çevre üzerinde doğrudan ve dolaylı toksik etkileri vardır. Hayvanlarda yemden yararlanma ve vücut ağırlığında azalma, immun sistem işlevlerinin baskılanması, karaciğer hasarı, kanda koagülasyon bozuklukları ve ölüme neden olabilmektedir (Quist ve ark., 2000).

Gerek ülkemizde gerekse yurt dışında besin maddelerindeki mikotoksinlerin saptanması ve etkileri konusunda oldukça fazla sayıda literatüre rastlanmaktadır. Ülkemizde de aflatoksinler üzerine birçok benzeri çalışma yapılmıştır.

Şanlı ve ark. (Şanlı ve ark., 1982b) tarafından tavuk yemlerinde ve yem ham maddelerinde ince tabaka kromatografisi (İTK) ile aflatoksin analizlerinin yapıldığı çalışmada, toplam 96 kanatlı yemi örneği incelenmiş; yumurta tavuğu yeminde 9.297 ± 2.668 µg/kg, broiler yeminde 4.018 ± 1.114 µg/kg ve yem ilkel maddelerinde 6.042 ± 1.557 µg/ kg düzeylerinde bulunmuştur. Kaya ve ark. (Kaya ve ark., 1996), 48 yem fabrikasından aldıkları 1200 yem ve yem hammaddesinde mikotoksin raslantı oranının % 1.08 olduğunu; mikotoksin saptanan yemlerin % 41'inde 8–320 ppb miktarlarında aflatoksin kalıntısı bulunduğunu bildirmişlerdir.

Polonya' da hayvan yemlerinde (625 yem ve 1120 yem hammaddesi) mikotoksin kirlilik düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada (Juszkiewicz ve ark., 1992), karma yemlerin hububattan daha fazla kirlenmiş olduğu ve karma yemlerin % 13 oranında aflatoksin içerdiği; tavuk yemlerinde mikotoksinlerle kirlenme düzeyinin diğer yem türlerine göre daha düşük olduğu (%4) bildirilmiştir.

Brezilya'da kedi ve köpek mamalarında aflatoksin analizi yapılmış olan bir çalışmada hayvan sağlığı üzerine oluşan riskler değerlendirilmiştir. Kırkbeş köpek maması, 25 kedi maması ve 30 kuşyemi olmak üzere 100 mama örneği Alfenas şehrindeki pet reyonlarından toplanmış ve İTK ile analiz edilmiştir. Alınan örneklerden içinde fıstık ezmesi ihtiva eden 12 mamanın hepsinde aflatoksin pozitif bulunmuştur. Böylece, aflatoksinin kanserojenik etkisinin hayvan sağlığında risk

ihtiva ettiği ve aflatoksin varlığının mamalarda kalite kaybına neden olduğu belirtilmiştir (Penido ve ark., 2002).

Türkiye’de köpek mamaları ve at yemleri üzerine yapılan bir çalışmada aflatoksin düzeyleri ELISA ile saptanmıştır. Onsekiz ticari köpek maması (7 ırka özel, 5 genç köpek, 6 erişkin maması) ve 20 ticari at yemi örneği Türkiye’deki farklı firmalardan 2000 yılı Haziran ayı ile 2001 yılı Haziran ayları arasında toplanmıştır. Köpek mamalarında <1.75 – 20 µg/kg, at yemlerinde <1.75 – 14 µg/kg minimum ve maksimum total aflatoksin miktarları belirlenmiştir. Bu analizlerin yapıldığı dönemde Türkiye’deki aflatoksin tolerans limiti herhangi bir yem için 10 µg/kg olarak belirlenmiştir. Bu limitlere göre 18 köpek maması örneğinden 3’ü (%16.7), 20 at yemi örneğinden 2’ si (%10) tolerans limitinin üzerinde bulunmuştur. En yüksek total aflatoksin miktarı 20 µg/kg olarak genç köpek mamasında bulunmuştur (Günsen ve ark., 2002).

Akut ve kronik aflatoksikozis olgularında ortaya çıkan klinik belirtiler ve patolojik bozukluklar seçkin nitelikli olmadığından, tanıları da güçlkle yapılır. Özellikle kronik olaylar her zaman gözden kaçabilir. Klinik belirtiler, çoğu karaciğer bozukluğu ve yetersizliğinde görülebilen tiptendir. Patolojik bozukluklar da hemorajik ve septisemik hastalıklarla karıştırılabilir. Mantar invazyonları her zaman için toksijenik nitelikli olmadığından, sadece hasta hayvanlara verilen besinlerdeki görülebilen küflere dayanılarak tanıya varmak da güvenli bir uygulama sayılamaz. Bu nedenle belirtilen zehirlenmelerin tanısında güvenilir bir uygulama olarak aflatoksinlerin varlığını ortaya koyabilen yöntemlere başvurulur (şanlı ve ark., 1982a).

Çok sayıda araştırmaya rağmen aflatoksikozis olguları köpeklerde bir sorun olmaya devam etmektedir. Günümüze kadar literatürlere yansıyan pek çok zehirlenme olgusu bildirilmiştir. ABD’nin Teksas eyaletinde 1998’de görülen zehirlenmede aynı firma tarafından üretilen 17 farklı marka ticari köpek yeminde 150-300 ppb AFB1’e rastlandığı ve bu yemleri 90-120 gün boyunca yiyen 55 köpeğin öldüğu, hatta bildirilmeyen vakalarla birlikte bu sayının daha yüksek olabileceği kaydedilmiştir. Araştırmalarda köpek yemine katılan mısırın aflatoksinle kirlendiği bildirilmiştir (Bingham ve ark., 2004).

Bastianello ve ark. (1987), Güney Afrika Cumhuriyeti'nde köpeklerde doğal olarak oluşan 1 akut, 7 subakut ve 2 kronik aflatoksikozis vakasını bildirmişlerdir. Greene ve ark. (1977) yine köpek mamasından bulaşan AFB1 nedeniyle bir köpeğin kronik karaciğer hastalığından öldüğünü, Hagiwara ve ark. (1990) 2 köpeğin aflatoksin içeren köpek maması nedeniyle dissemine intravaskular koagülasyon nedeniyle Sao Paulo'da öldüğünü, Krisnamachari ve ark. (1975), Hindistanın Batı kısımlarında yoğun bir şekilde *Aspergillus flavus* ile kirlenmiş mısırları tüketen insan ve köpeklerde 1 ay boyunca 2-6 mg arasında aflatoksin alanlarda hepatitisten dolayı ölüm vakalarıyla karşılaştığını, Stenske ve ark. (2006) ise yine ABD'de Aralık 2005'te 2 köpeğin aflatoksin bulaşmış köpek maması yedikten sonra akut karaciğer yetmezliğinden dolayı öldüğünü bildirmişlerdir.

1.1.1. Mikotoksin Analiz Yöntemleri

Mikotoksinlerin analizinde, İnce tabaka kromatografisi (TLC), Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), Enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi (ELISA) ve enzim aktivitesine bağlı immonuteknik (Enzyme Multiplied Immunotechnique/EMIT) uzun zamandır kullanılmaktadır. Bunların dışında, Flouresans Polarization Immunoassay (FPIA) yöntemi de mikotoksinlerin ölçümünde deneme aşamasındadır ve kullanılabileceği yönünde olumlu sonuçlar bildirilmiştir (Bonwick ve ark., 2004; Bozoğlu, 2005; Nasır ve ark., 2003; Shim ve ark., 2004).

1.2. Nitrat ve Nitritler

Nitrat ve nitritler, tatlı sularda, sebzelerde, meyvelerde, yem bitkilerinde, et ve çürüyen organik maddelerde doğal olarak bulunur. Et endüstrisinde sucuk, sosis, salam ve salamura edilmiş et ürünlerinin üretiminde koruyucu madde olarak kullanılır (Ceylan, 1998; Hall ve ark., 1997; Schneider ve ark., 1997).

Gıda sektöründe değişik üretim tekniklerinin gelişmesi, ürün çeşitliliği ve kalitede standardizasyonun gerekliliği, gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir (Saldamlı, 1998). Bu maddelerden nitrat ve nitrit; sucuk, sosis, salam ve pastırma gibi kürlenmiş et ürünleri ve balıkta renk, tat, koku ve görünüm yönünden arzu edilen nitelikleri verebilmek ve mikrobiyal sabiteyi kontrol amacıyla

yaygın olarak kullanılmaktadır (Saldamlı, 1998; akmakçı ve ark., 1995; Yücel ve ark., 1987; Anonim, 1996).

Nitrat ve nitritler yüzey sularında, içme sularında, bitkilerde ve alınan diğler besin maddelerinde belirli düzeyleri aştığında, doğrudan veya dolaylı olarak etkilerini çevre, insan ve hayvan sağlığı üzerinde gösterirler.

Besinler vasıtasıyla sürekli olarak yüksek miktarlarda nitrat ve nitrit alınması sonucunda oluşan nitrozaminler sindirim sisteminde bozukluklara neden olabilmektedir. N-nitrozamin bileşiklerinin deney hayvanlarında kansere yol açtığı, bir kısmının da mutajenik ve teratojenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Günümüzde yapılan epidemiyolojik ve klinik araştırmalar yüksek düzeydeki nitrat ve nitritlerin insanlarda kanser riskini artırdığı yönünde yeterli kanıta sahip değillerdir (Environmental Health Criteria 5, 1977; Brunning-Fann ve ark., 1993a; Brunning-Fann ve ark., 1993b).

Hayvanlar tür ve yaşa bağlı olarak nitrat ve nitritle zehirlenmeye karşı farklı duyarlılıklara sahiptir. Genç hayvanlar genellikle daha duyarlıdır. Bu zehirlenmelerin en sık olarak rastlanan kaynağı yem maddeleridir. Hayvanın sağlık durumu da önemli bir faktördür. Sağlıklı hayvanlar daha az etkilenirler. Beslenme yetersizliği, anemiye neden olan faktörler, solunum sistemi ve paraziter hastalıklar zehirlenmeye karşı duyarlılığı artırır (Hibbs ve ark., 1978).

Nitrat hayvanlar tarafından alındıktan sonra sindirim kanalında bakteriyel etkinlikle amonyağa indirgenirken ara metabolizma ürünü olarak nitrit şekillenir. Aşırı miktarda nitrat alınması durumunda nitrit şekillenme hızı nitrit yıkımından fazla olmakta ve sonuçta sindirim kanalında nitrit yoğunluğu artmaktadır (Geurink ve ark., 1979; Geurink ve ark., 1982; Hatch, 1987; Kemp ve ark., 1977; Nakamura ve ark., 1979).

Nitratların sindirim sisteminde indirgenmesinde nitrit ilk ara üründür. Hayvanlar için nitrata göre yaklaşık 10 kat daha toksik olan nitrit, hemoglobini oksijen taşıyamaz formu olan methemoglobine çevirir (The Merck Veterinary Manual, 1998; Osweiler ve ark., 1985; Cowley ve ark., 1977).

Yüksek düzeylerde nitrat içeren yem ve diğler besin maddeleri insan ve hayvanlar tarafından tüketildikten sonra nitratın sindirim kanalında mikrobiyel hareketlilik sonunda nitrite dönüşmesi zehirlenme oluşturabildiği gibi, bu tür besin

maddeleri tüketilmeden önce uygunsuz koşullarda uzun süre depolanmaları halinde de içerdikleri nitrat nitrite dönüşebilmektedir. Bu gibi durumlarda yem ve diğer besin maddelerinin zehirliliği artabilir (Buck ve ark., 1976; Deeb ve ark., 1975; Jones ve ark., 1965; Phillips, 1968).

Akut nitrit zehirlenmesi nitrit iyonlarının iki şekilde etki etmesine bağlıdır. Bunlardan birincisi direkt olarak düz kasları özellikle damar düz kaslarını gevşetmeleridir. Sistemik arteriyel kan basıncında düşme ve doku perfüzyonunda azalma gözlenir (Hatch, 1987; Vermut ve ark., 1987). İkinci etki şekli ise hemoglobin ile etkileşmesidir. Bir molekül nitrit iki molekül hemoglobini etkiler. Bu etkileşme sonucunda iki değerli demir üç değerli demire oksitlenmek suretiyle methemoglobin oluşmasına neden olur. Oluşan methemoglobinin oksijen bağlama ve nakletme yeteneği yoktur. Kandaki methemoglobin düzeyi %50'yi geçtiğinde özellikle hareketli hayvanlarda ölüm görülebilir; % 80–90 arasında ise anoksiden ölüm oluşur (Buck, 1970a; Horio, 1982). Nitratla akut zehirlenme normal şartlarda nadiren oluşmaktadır. Kısa süre içinde aşırı miktarda nitrat içeren yemlerle beslenme sonucu akut zehirlenme kolayca oluşur. Yemlerde akut zehirlenmeye neden olabilecek potansiyel nitrat miktarları Tablo-1'de görülmektedir (Osweiler ve ark., 1985; Rasby ve ark., 1996).

Çizelge 1.2.1. Yemlerde toksik olabilecek nitrat düzeyleri (kuru maddede).

Nitrat birimleri	Potansiyel toksik düzeyler	
	%	ppm
Nitrat azotu ($\text{NO}_3^- \text{N}$)	≥ 0.22	≥ 2260
Nitrat iyonu (NO_3^-)	≥ 1.00	≥ 10000
Potasyum nitrat (KNO_3^-)	≥ 1.6	≥ 16300

Nitratla akut zehirlenmenin klinik belirtileri türlere göre farklılıklar gösterir. Genellikle tek mideli hayvanlarda şiddetli gastritisle seyreder. Nitrattan farklı olarak nitrit methemoglobinemi oluşturabilir. Dolaşan kanda şekillenen methemoglobin dokulara oksijen taşınmasını engeller. Methemoglobin düzeyleri %30-40'a

ulaştığında klinik belirtiler görülmeye başlar. Belirtiler ani bir şekilde başlar ve dispne, hızlı ve zayıf kalp atışı, köpüklü salivasyon, sürgün, sık idrar yapma, hareket bozukluğu, halsizlik, kasılma, tremor, mukoz zarların mavi kahverengimsi koyu bir renk alması, pupillalarda belirgin bir genişleme, vücut ısısında düşme ve koma görülür. Ölüm bir saat içinde veya solunum güçlüğüne başlangıcından itibaren 3–4 saat içinde şekillenebilir (Osweiler ve ark., 1985; Cowley ve ark., 1977; Yeruham ve ark., 1997; Hibbs ve ark., 1978).

Otopside kan koyu çikolata renginde görülür ve pıhtılaşma normaldir. Ayrıca perakut bir durum söz konusu ise karakteristik lezyonlar görülmeyebilir. Diğer durumlarda ise kanamalı mide bağırsak yangısı, iç organlarda kanama, böbreklerde ve idrar kesesinde yangı görülebilir (The Merck Veterinary Manual, 1998; Bartık ve ark., 1981; Brunning-Fann ve ark., 1993).

Subletal dozların alınmasına bağlı olarak şekillenen kronik nitrat zehirlenmesinde ise A-E vitamin eksikliği ve tiroid metabolizmasının bozulması, diş gıcırdatma, huzursuzluk, kan basıncında düşme, canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanmanın azalması, kondüsyon bozukluğu, erken ve ölü doğumla birlikte yavru kayıpları gibi belirtiler gözlenir (Buck, 1970b; Dollahite ve ark., 1970; Lee ve ark., 1970; Ridder ve ark., 1974).

Nitratla subakut ve kronik zehirlenmede yemlerde 800–2000 ppm nitrat azotu (% 0.6 – 1.5 potasyum nitrat) bulunması gerekmektedir. Hayvanların genel performansında da azalma görülür (Bartık ve ark., 1981). Başlıca semptomlar iştah kaybı, gelişmede gerileme, ağırlık artışında azalma, süt veriminde düşme, gebeliğin ilerleyen döneminde nadiren abort, üreme problemleri, verimde azalma ve bazen de A vitamini yetersizliğidir (Osweiler ve ark., 1985; Hibbs ve ark., 1978; Brunning-Fann ve ark., 1993).

Nitrat ve nitritle zehirlenmede semptomların şiddeti methemoglobin düzeylerine bağlı olarak değişir. Hayvanlardaki methemoglobin düzeyleri genellikle % 0–3 arasında değişmektedir. Bu düzeyler köpekte %0.90, kedide %1.10'dur (Watanabe ve ark., 1973).

Nitrat ve nitritlerin yarı ömürlerinin saptanması amacıyla bazı çalışmalar yapılmıştır. Schneider ve Yeary, (1975), damar içi olarak köpeklere verilen nitrat ve nitritin yarı ömürlerini sırasıyla 44.681 ve 0.499 saat olarak belirlemişlerdir.

Nitrat, nitrit ve bileşiklerinin besin maddeleri ve çevre üzerindeki etkileri nedeniyle düzeylerinin yakından izlenmesi ve sürekli kontrol altında tutulması gerekmektedir. Aksi takdirde, nitrat ve nitrit bileşikleriyle akut ve kronik zehirlenmeler ortaya çıkmakta ve kayıplara yol açabilmektedir. Nitrat ve nitritlerin canlılar üzerindeki etkilerinin yeterince aydınlatılabilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmanın planlanmasında kedi ve köpek mamalarının marka ve miktar bazında ithalatındaki artış, ev gıdası yerine kuru mama kullanma payının büyümesi ve bu konuda kapsamlı bir araştırmanın bulunmaması başlıca rol oynamıştır.

Ülkemizde üretilen karma yem ve yem hammaddelerindeki nitrat ve nitrit içeriğinin çeşitli faktörlere göre değişimi üzerine yapılan bir çalışmada Yavuz, (1992), hayvanların beslenmesinde kullanılan yem ve yem hammaddelerinin farklı ortamlarda (aydınlık, karanlık ve nemli) 5 ay süreyle tutulması sonucu nitrat ve nitrit içeriklerinin değişip değişmediği araştırılmıştır. Ayrıca yem ve yem hammaddelerinin nitrat ve nitrit içeriklerinin yıllara göre karşılaştırılması da yapılmıştır.

Bu amaçla illerdeki yem fabrikalarından temin edilen 1988 yılı ürünü 161 numune ve 1989 yılı ürünü 70 numune ve yem hammaddesinin nitrat ve nitrit yönünden analizleri yapılmıştır. 1989 yılı ürünü yem ve yem hammaddeleri kendi aralarında gruplandırıldıktan sonra 5 ay süreyle aydınlık, karanlık ve nemli ortamlarda tutulup süre sonunda nitrat ve nitrit yönünden tekrar analizleri yapılarak ilk değerleri ile karşılaştırması yapılmıştır.

Analiz sonuçlarında toplam 70 numuneden 52'sinde (%74. 3) değişen oranlarda nitrat nitrite indirgenmiştir. Tutulma ortamlarına göre nitratın nitrite dönüşmesi şu şekilde dağılım göstermektedir: Aydınlık ortamda tutulan numunelerin %20'si, karanlık ortamda tutulan numunelerin % 17.1'i ve nemli ortamda tutulan numunelerin % 37. 1'inde nitratın nitrite dönüşmesi saptanmıştır. Sonuç olarak, hayvanların beslenmesinde kullanılan yem ve yem hammaddelerinin uzun süre değişik koşullar altında depolanmaları halinde içerdikleri nitratın bir kısmının nitrite indirgeneceği, bu indirgenmenin nitratı nitrite indirgeyen bakterilerin gelişimi ve

aktivasyonunu artıran uygunsuz depolama koşulları altında yüksek düzeylerde olabileceği kanısına varılmıştır (Yavuz, 1992).

Yapılmış olan bir başka çalışmada Anonim, (1988), ise ton balık konservelerinde nitrat ve nitrit düzeyleri araştırılmıştır. Kutulanmış balık konserveleri taze balıkların kalite niteliklerine sahip, çeşitli ön işlemler uygulanmış balık veya balık kısımlarına tuz, yemeklik bitkisel yağ ve sos gibi lezzet verici maddeler ilave edilerek hazırlanmış, hermetik kaplarda ısı işlemiyle dayanıklı hale getirilmiş ürünlerdir.

Son yıllarda ülkemizde değişen yaşam koşulları ve beslenme alışkanlıklarına paralel olarak, bu çeşit hazır ve yarı hazır gıdalara talep artmıştır. Yapılan bu araştırma kapsamında, ülkemizde yaygın olarak tüketilen ton balık konserveleri nitrat ve nitrit düzeyleri yönünden incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, örneklerin tamamının farklı düzeylerde olmak üzere nitrat ve nitrit içerdiği tespit edilmiştir. Örneklerde nitrat düzeyi 4.27–116.17 ppm arasında (46.88 ± 4.89 ppm), nitrit düzeyi ise 2.06- 17.60 ppm arasında (6.23 ± 2.06 ppm) saptanmıştır (Ağaoğlu ve ark., 2002).

Gıda zehirlenmelerinin nedeni olan organizmaların gelişmesinin engellenmesi ve mikrobiyel bozulmanın önlenmesi için kedi ve köpek mamalarına preservative olarak nitritler sıkça katılır. Nitritlerin kullanımıyla işlenmiş et ürünleri renklerini ve lezzetlerini korurlar, *Clostridium botulinum*'un gelişmesi ve toksin oluşumu önlenir, oksidasyona karşı yağların stabilitesi sağlanmış olur.

Nitrit zehirlenmesiyle ilgili kamuoyuna yansıyan bir olayda Yeni Zelanda'da 2 ayrı evde yaşayan 3 kedi, ticari kedi mamasına koruyucu olarak katılan sodyum nitrit'in toksik yoğunluklarına maruz kalmak suretiyle öldüğü bildirilmiştir. Kedilerin 2850 mg/kg toplam nitrit içeren aynı mamalardan yedikleri anlaşılmıştır. Aynı marka köpek maması yiyen 4 köpekten 2 tanesi ölmüş, diğer iki tanesi ise tedavi edilmiştir (Worth ve ark., 1997).

1.2.1 Nitrat ve Nitrit Analiz Yöntemleri

İki farklı yöntem ile değişik besin maddelerinde bulunan nitrat ve nitrit içeriklerinin ölçülmesi mümkündür. Besin maddelerinde bulunan nitrat ve nitrit içerikleri nitratin nitrite indirgenmesi ya da nitritin nitrata oksitlenmesi esaslarına dayanır. Bunlardan

total nitrat ölçümü esasına dayanan yöntemlerin özellikle düşük düzeylerde nitrat ve çözünebilir organik madde içeren örneklerde hatalı sonuçlar verme olasılığının yüksek olması nedeniyle, son yıllarda nitrit ölçümü esasına dayanan yöntemlere daha fazla itibar edilmektedir (Usher ve ark., 1975). Bu nedenle bütün dünyada yaygın biçimde kullanılmaktadır (Environmental Health Criteria 5, 1977).

Toplam nitrit ölçümünde kullanılan yöntemlerde ilke olarak bakır, çinko, hidrazin sülfat, kadmiyum gibi çeşitli indirgeyiciler kullanılarak ortamdaki nitrat içeriği nitrite indirgenir. Böylece oluşturulan toplam nitrat içeriği diazolama ve kenetleme belirteçleriyle renkli bileşiklere dönüştürülmek suretiyle spektrofotometrik ölçümlerde kullanılır. Ancak, yukarıda sıralanan indirgeyicilerin çoğunluğu ya yetersiz indirgeyici etkinlik gösterebilmekte ya da nitriti amonyağa kadar indirgeyebilmektedir. Bu alanda yapılmış araştırmaların hemen hepsinde süngerimsi kadmiyum ile yapılan indirgeme işleminin en güvenli seçeneği oluşturduğu görüşünde birleşilmektedir (Schneider ve ark., 1997; Usher ve ark., 1975).

Nitrat analizi, doğrudan nitrat olarak veya nitratın kadmiyum, hidrazin gibi maddelerle nitrite indirgenmesiyle dolaylı olarak yapılmaktadır. Başlıca nitrat ve nitrit analiz yöntemlerinden biri olan *Ultraviyole Spektrofotometrik Yöntem*; düşük inorganik maddeye sahip, kontamine olmamış numunelerin analizi için oldukça uygundur (APHA, 1992; Anonim, 1996). *İyon Kromatografi Yönteminde* duyarlılık limiti 0.1 - 0.5 mg/L nitrat iyonu arasındadır (Edgell ve ark., 1994; Boermans, 1990). *Nitrat Elektrod Yöntemi*, temiz ve atık suların ve bitkilerin analizinde kullanılmaktadır (APHA, 1992; Carlson ve ark., 1986). *Kadmiyum İndirgeme Yönteminin* duyarlılık limiti 0.01 - 1 mg/L nitrat azotu arasındadır. Diğer yöntemlerin yeterince duyarlı olmadığı durumlarda 0.1 mg/L'nin altındaki nitrat yoğunlukları için özellikle tavsiye edilmektedir (APHA, 1992; Anonim, 1990; Beljaars ve ark., 1994; Hyde ve ark., 1977). Nitrat azotu olarak yöntemlerin duyarlılık limitleri *Otomatik Kadmiyum İndirgeme Yönteminde* 0.5–10 mg/L (APHA, 1992; Anonim, 1996; Beljaars ve ark., 1994); *Titan Klorür Yönteminde* 0.01–10 mg/L (APHA, 1992); *Hidrazin ve Otomatik Hidrazin İndirgeme Yöntemlerinden* otomatik hidrazin indirgeme yönteminde 1.01-10 mg/L (Anonim, 1990; Hyde ve ark., 1977); *Otomatik fenat Kolorimetrik Yönteminde* 0.05-2 mg/L arasındadır (APHA, 1992).

1.3. Sınır değerler

Türkiye’de 20.09.1991 tarih ve 20997 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Karma Yem Beyan ve Tescil İşlemleri Hakkında Tebliğe (Tebliğ No: 91/14)göre AFB1’in gıda değeri olmayan yemlerde bulunmasına izin verilen en yüksek miktarı (diğer yemler sınıfında verilmiştir) 20 ppb olarak verilmiş ve yıllarca bu sınır uygulanmıştır. Ancak 5.2.2005 tarih ve 25718 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan 2005/3 sayılı Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğe göre bu sınır değer kaldırılmıştır. Gerekçe olarak da Avrupa Birliği’ne(AB) uyum çalışması gösterilmiştir. Gerçekten de AB mevzuatında günümüzde kedi veya köpeklerin yemlerinde aflatoksinler için herhangi bir sınır değer verilmemektedir. Ayrıca, nitrat değeri için de hiçbir sınır değer verilmezken nitrit için verilen sınır değerler 1991’den itibaren güncelliğini korumaktadır. Son olarak 11.06.2008 tarih ve 26903 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan 2008/34 sayılı “*Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ*”de de bu değerler aynı kalmıştır (Çizelge 1.3.1).

Çizelge 1.3.1. Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğe göre yemlerde bulunmasına izin verilen yüksek nitrit ve AFB₁ miktarı (Tebliğ No: 2005/3)

İstenmeyen Maddeler	Hayvan Beslemede Kullanılan Yemler	Kabul Edilebilir En Çok Miktar (% 12 rutubet içeren yeme göre) (mg/kg)	
Nitritler	Balık unu	60 (sodyum nitrit olarak ifade edilir)	
	Kuş ve akvaryum balığı yemleri dışındaki ev hayvanları yemleri hariç, tam yemler	15 (sodyum nitrit olarak ifade edilir)	
	Yem maddeleri	0.02	
	Sığır, koyun ve keçi tam yemleri; aşağıdakiler dışında	0.02	
	-Süt sığırları için tam yemler	0.005	
	-Buzağı ve kuzular için tam yemler	0.01	
	Aflatoksin B ₁	Kanatlı ve domuz tam yemleri (genç hayvanlar hariç)	0.02
		Diğer Tam Yemler	0.01
		Sığır, koyun ve keçi tamamlayıcı yemleri (süt hayvanları, buzağı ve kuzu yemleri hariç)	0.02
		Kanatlı ve domuz tamamlayıcı yemleri (genç hayvanlar hariç):	0.02
Diğer Tamamlayıcı Yemler		0.005	

Kaynak: Anonim, 2005

1.4.Çalışmanın Amacı ve Önemi

Günümüzde gerek kullanım kolaylığı ve gerekse sağlık açısından uygunluğu dolayısıyla tercih edilen ve önerilen hazır kedi ve köpek mamalarının kullanımı çok yaygınlaşmıştır. Ticari olarak üretilen kedi ve köpek mamalarındaki aflatoksin, nitrit ve nitrat düzeyleri ile ilgili bildirilmiş çalışmalar yeterli değildir. Daha çok besi değeri olan hayvanlar, bitkiler ve doğrudan insan sağlığını etkileyen olgular üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmada ise tüketime sunulan yerli ve ithal kedi ve köpek mamalarındaki aflatoksinler, nitrat ve nitrit düzeylerinin belirlenmesi, elde edilen bulguların kedi ve köpeklerin sağlığı yönünden irdelenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma materyali olarak, Ankara bölgesinde özel kuruluşlara ait 50 kedi (25' i ithal ve 25' i yerli üretim) ve 50 köpek (25' i ithal ve 25' i yerli üretim) maması olmak üzere toplam 100 mama örneği AFB1, B2, G1, G2, nitrat ve nitrit yönünden analiz edilmiştir. Örnekler değişik kilogramlardaki (2 kg, 3 kg, 15 kg) kapalı paketlerden, deneme boyu olarak üretilen küçük (100 g) paketlerden ve açıkta satılan kuru mamalardan 100' er gram miktarında alındı.

Kedi ve köpek kuru mamaları tavuk eti, hindi eti ve kuzu etinden üretilmektedir. Bu ana maddelerle beraber hazırlanışında öğütülmüş mısır gluteni unu, kurutulmuş pancar küspesi, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş arpa, balık yağı, kurutulmuş bütün yumurta, keten tohumu, havuç, bezelye, domates posası, vitaminler ve mineraller ilave edilmektedir.

Bir kuru mamanın içerisinde sayılan et türlerinden bir çeşit veya tavuk ve hindi eti karışımı birlikte bulunabilir. Yukarıda belirtilen maddelerin oranları da değişkendir. Bu maddelerin miktarları kuru mamanın kedi veya köpek kuru maması olmasına, ürünü tüketecek canlının yaş aralığına göre değişken standartlarda üretilir.

Numuneler 2007 yılı aralık ayı ile 2008 yılı nisan ayını kapsayan dönem içerisinde alındı ve analizleri yapılmıştır. Numuneler alınmalarını takiben hemen analiz edilmiştir.

2.1. Aflatoksin Analizi

Numunelerdeki mikotoksin kalıntılarının belirlenmesi için karma yemlerde aflatoksin kalıntılarının aranması amacıyla kullanılan Roberts ve Peterson'dan (Robertson ve ark., 1979) Şanlı ve ark. (Şanlı ve ark., 1982) tarafından modifiye edilmiş olan yöntemden yararlanıldı. İnce tabaka kromatogramındaki lekelerin doğrulanması amacıyla aflatoksinler için sülfürik asit kullanıldı (Siriwordene, 1977). Sonuçlar ppb olarak değerlendirildi.

2.1.1. Adsorbanlar

1. *Silikajel-G 60* (Merck, 20x20 cm², absorban kalınlığı 0.2 mm)
2. *Silikajel* (kolon kromatografisi için, 70–230 mesh)

2.1.2. Ayıraçlar:

- 1- *Sodyum sülfat*: (Anhidr, granüllü, Merck, Art. 1.06643).
- 2- *Kurşun asetat çözeltisi*: (Merck, Art. 1.07375) 20 g nötral kurşun asetat trihidrat, balon jofede bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra, 0.3 ml glasiyal asetik asit katıldı ve distile su ile hacmi 100 ml'ye ulaştırıldı.
- 3- *Doymuş sodyum klorür çözeltisi* (Merck, Art. 1.06404).
- 4- *Sülfirik asit* (% 25 'lik) (Merck, Art. 1.00713).
- 5- *Formik asit* (Merck, Art. 1.00264).
- 6- *Potasyum klorür çözeltisi* (% 4 'lük sulu çözeltisi) (Merck, Art. 1.04936).
- 7- *Aflatoksin standartları*: Özel ambalajlar içerisinde sağlanan kuru, kristalize toz halindeki aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ standartları (Sigma Chemical Company), etiketleri üzerindeki ağırlıkları dikkate alınarak 8-10 µg/ml'lik yoğunluk sağlayacak şekilde benzol: asetonitril (98:2) karışımında çözdürüldü. Aynı çözeltinin uygun bir bölümü benzol: asetonitril karışımıyla 0.5 µg/ml yoğunluğuna kadar seyreltilmekle ince-tabaka kromatografisine uygulama çözeltisi hazırlandı. Denemelerde kullanılmak üzere, uygulama çözeltisinden belli bir miktar ayrıldıktan sonra geri kalan standart depo çözeltisi ile birlikte ayrı ayrı mg düzeyine kadar tartılarak ağırlıkları referans amacıyla kaydedilip, şişeleri alüminyum folyo ile sarılmış halde soğutucuda saklandı. Çalışmalar sırasında soğutucudan çıkartılan standart ısısının oda ısısına gelmesi için yeterli süre bekletildi.

2.1.3. Çözücüler

- 1- *Asetonitril* (Merck, Art. 1.00030).
- 2- *Benzol* (Dop, 71–43–2).
- 3- *İzooktan* (Merck, Art. 1.04727).
- 4- *Diklorometan* (Merck, Art. 1.06050).
- 5- *n-Hekzan* (Merck, Art. 1.04368).
- 6- *Metanol* (Merck, Art. 1.06008).

7- *Toluol* (Merck, Art. 1.08323).

8- *Etil asetat* (Merck, Art. 1.00864).

Analizde kullanılan tüm çözücü ve ayıraçlar kromatografik analiz kalitesinde seçildi.

2.1.4. Aygıtlar

1- İnce-tabaka kromatografisi aygıtı ve ekleri (Desaga).

2- Ultraviyole (UV) lambaları (CAMAG UV- CABINET II).

3- Rotatif evaporatör (Buchi).

4- Homojenizatör (Virtis, Model-23).

5- Etüv, desikatör, saç kurutma makinesi, ayırma hunileri, santrifüj tüpleri (ml bölümlü).

Çalışmaya başlarken 1 saat önceden iyice doyması için mikotoksin tankı hazırlandı. Mikotoksin için development tankı Toluol (60 ml) + Etil Asetat (30 ml) + Formik Asit (10 ml) konularak hazırlandı.

2.1.5. Özütleme

Kuru mama numuneleri sert, şekil verilmiş ve iri taneli halde bulunduğu için önce numuneden bir kısım alınıp havanda ezildi. Ezilen numuneden hassas terazide 25 g tartılıp behere alındı. Bu numuneye 90 ml asetonitril + %4 potasyum klorür çözeltisi karışım halinde toplam 100 ml olarak ilave edildi. Bu karışım yem içindeki mikotoksinlerin solvent içine geçmesi için kullanıldı. Asetonitril- potasyum klorür mikotoksinleri çözerek içine aldı.

Mekanik ve manyetik karıştırıcıda 3 dk çalkalandı. Whatman No 41 süzgeç kâğıdından süzüldü. 50 ml süzüntü behere alındı. Bu süzüntüye 5 ml %20 kurşun asetat ilave edildi ve 2 dk çalkalandı. 5 dk bekletildikten sonra 5 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildi. Kurşun asetat ve potasyum klorür sodyum asetat oluşturarak proteinleri çöktürdü. 2 dk çalkalandı. 5 dk bekletildikten sonra 25 ml 0.1'lik NaHCO₃ ilave edildi, karıştırıldı. Karışım süzgeç kâğıdından ayırma hunisine süzüldü.

Ayırma hunisindeki karışıma 25 ml izooktan ilave edildi. Ayırma hunisinde çalkalama işlemi yapılıncaya iki faz halinde karışım görüldü. Bu karışımda altta

bulunan 2. faz mezure alındı. Üstteki faz izooktan kısmı olup atıldı. Mezure alınan faz ise tekrar ayırma hunisine konup ikinci kez 25 ml izooktan ilave edilip çalkalanılarak alttaki kısım mezure alınıp üstteki kısım atıldı. Mezurdaki faz tekrar ayırma hunisine kondu. İzooktan aşaması çözeltiliyi yağlardan arındırmak için yapıldı. İzooktan çözelti içindeki yağları aldı. Ayırma hunisine toplam 50 ml izooktan konulup bu işlem tek aşamada da bitirilebilir. Tek aşamada yapıldığında yine alttaki faz mezure alınıp üstteki faz atılır.

Ayırma hunisine konulmuş olan karışıma 25 ml diklorometan ilave edildi ve 5 dakika süreyle karıştırıldı. Aflatoksinler diklorometan fazına geçti. Alttaki faz diklorometan faz olup susuz Na₂SO₄ lı süzgeç kâğıdından yavaş yavaş cam balona süzüldü.

Balonlar rotavaporda 45- 50°C 'de 0. 5 – 1 ml kalacak şekilde veya tamamen uçuruldu. Balonlar uçurulduktan sonra içine uçurulan madde (diklorometan) 1 ml kondu. Elde ettiğimiz her ekstrattan silika jel plaka üzerine 10 µl uygulandı. Yanına yine aynı miktarda aflatoksin standartları damlatıldı. Sonra plaka önceden hazırlanan mikotoksin tankına yerleştirildi. Plaka işaretli çizgiye yükselinceye kadar beklenilip, çıkartılıp ve kurutuldu. Önce Uv ışıkta incelendi (mavi, yeşil floresan lekeler görülür). %25'lik sülfürik asit püskürtüldü. Kurutuldu. Uzun veya kısa dalga UV ışık altında incelendi.

Çizelge 2.1.5.1. İTK plakasının incelenmesi ve değerlendirilmesi.

Mikotoksin	Püskürtme ayıracı	Görünüşü
AFB1,B2, AFG1,G2	Ayıraç püskürtmeden	Kısa dalga UV ışıkta AFB1 mavi, AFG1 yeşil floresans
	Sülfürik asit	Mavi ve yeşilden sarı renge dönüş

2.1.6. Hesaplama

Hesaplama yapılırken dikkat edilecek nokta 50 ml behere süzülerek alınmış olan miktar numunenin yarısı olup ekstraksiyon için numunenin yarısının hesapta kullanılmasıdır. Buna göre hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\mu\text{g/ g (ml)} = \frac{\text{S.Y.V.A}}{\text{X.W}} = \text{ppm}$$

A = Numunenin İTK'da standartta oranı

S = Uygulanan standartın miktarı (ml)

Y = Mikotoksin yoğunluğu ($\mu\text{g /ml}$)

V = Numunenin son sulandırıcısı (ml)

X = Numunede ekilen miktar (μl)

W = Ekstraksiyon için alınan numunenin miktarı

2.2. Nitrat ve Nitrit Analizi

Nitrat ve nitrit birçok yöntemle analiz edilebilir. Bu araştırmada kuru mamaların nitrat analizinde dünyanın birçok yerinde hala en çok yararlanılan yöntemlerden biri olan kadmiyum indirgeme yöntemi tercih edildi.

Kedi ve köpek kuru mamalarındaki nitrat ve nitrit analizi için, temel olarak Sen ve Donaldson (1978) tarafından bildirilen, Yavuz (1992) ve Oruç (1999) tarafından modifiye edilen kolorimetrik yöntem kullanıldı. Yöntem homojenize edilmiş veya öğütülmüş numunelerden nitrat ve nitritin distile su ile ekstrakte edilmesi esasına dayanır. Ekstrakte edilen nitrat, kadmiyum kolonundan geçirilerek nitrite indirgenir. Asidik pH'daki nitrit içeriğine renk ayırıcı olarak sülfanilik asitle karıştırılan N- (1-Naftil) etilen daimin (NED) dihidroklorid ilave edilerek kırmızı azo boyası formuna dönüştürülen nitrit kolorimetrik bir yöntemle ölçülür.

2.2.1. Ayıraçlar

1- Amonyum klorür tampon çözeltisi (pH 9.6–9.7): 20 ml HCl, 500 ml distile su ve 50 ml NH₄OH (Merck, Art. 1.05423) ile karıştırılır. 1 litreye tamamlanır. İyice karıştırılır. pH kontrol edilir. pH yüksek ise HCl ile, düşük ise NH₄OH ile 9.6-9.7 5' e olacak şekilde ayarlanır.

2- Çinko sülfat çözeltisi (0.42 M): 120 g ZnSO₄.7H₂O (Merck, Art. 1.08883) 1 litrelik bir balon jojeye tartılıp bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlanır.

3- Sodyum hidroksit çözeltisi: Sodyum hidroksitin (Merck, Art. 1.06498) distile su ile % 2'lik çözeltisi hazırlanır.

4- Kadmiyum sülfat (0.14M): Litrede 37 g 3CdSO₄ H₂O (Merck, Art. 1.02027) içeren çözeltisi distile su ile hazırlanır.

5- Çinko granülü (Merck, Art. 1.08755). 40-60 mesh

6- N-(1-Naftil) etilen daimin dihidroklorür (NED) çözeltisi: NED (SIGMA-N-9125 Lot 39H0711) % 60'lık glasiyal asetik asit içerisinde %0.1'lik olarak hazırlanır. Çözelti ağzı cam kapaklı bir şişe de saklanır. Buzdolabında bir hafta dayanır ve hafta da bir yenilenir.

7- Sülfanilamid çözeltisi: 2. 5 g sülfanilamid (Merck, Art. 1.11799) 175 ml distile suda çözdürülür ve üzerine 75 ml glasiyel asetik asit eklenir. Ağzı cam kapaklı bir şişede oda ısısında saklandı.

8- Hidroklorik asit çözeltisi (0.1 N): Derişik HCl'den (Merck, Art. 1.00314) 4.14 ml alınıp distile suyla 500 ml'ye seyreltilmek suretiyle hazırlandı.

9- Sülfanilik asit çözeltisi: 10 g sülfanilik asit (Merck, Art 685) 700 ml distile suda çözdürüldü ve üzerine 300 ml glasiyal asteik asit eklendi. Ağzı cam kapaklı bir şişede oda ısısında saklandı.

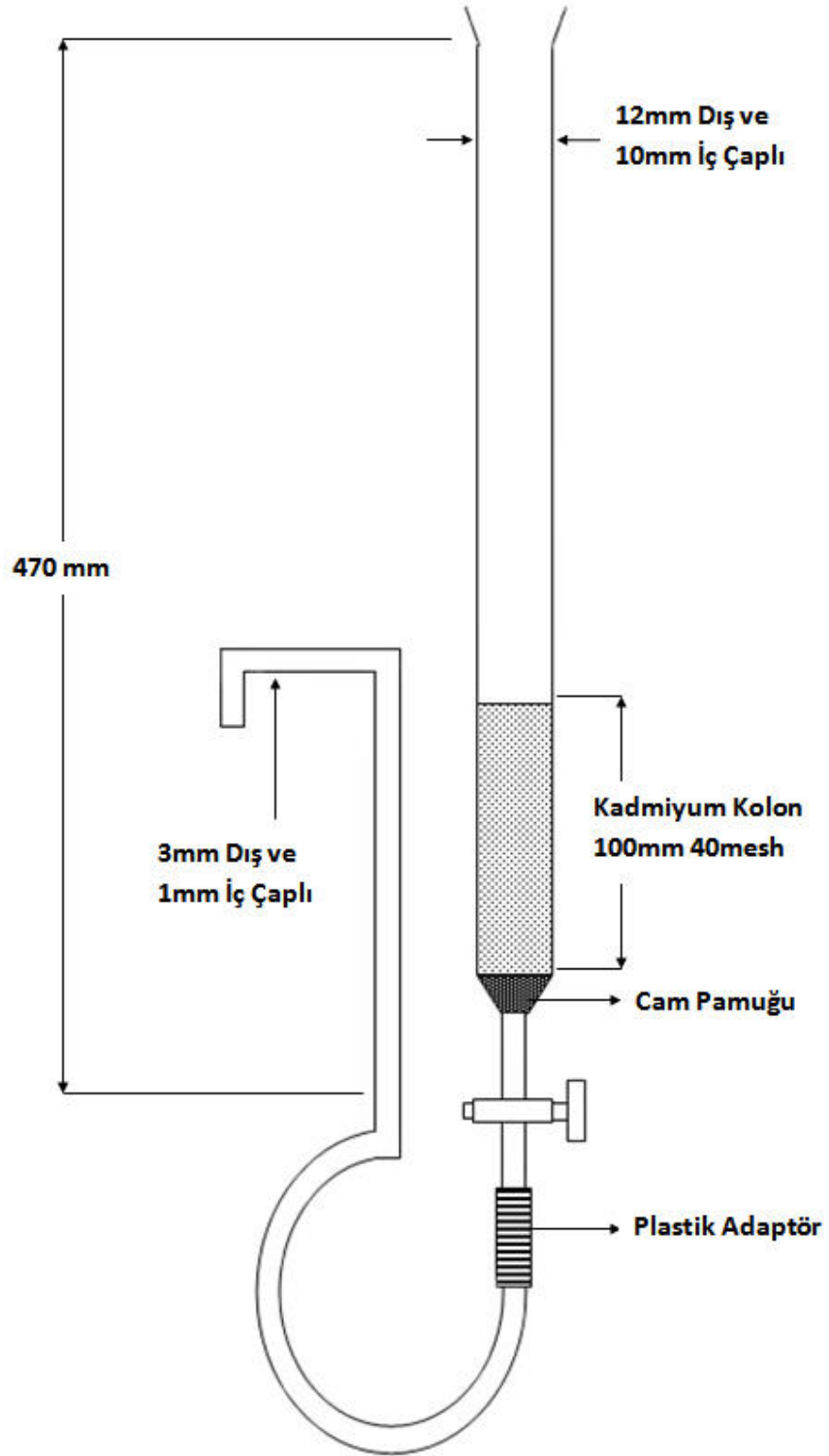
10- Renk ayıracı: Kullanmadan önce eşit hacimde sülfanilik asit çözeltisi ile NED çözeltisi karıştırıldı.

2.2.2. Aygıtlar

- 1- **Kadmiyum indirgeme kolonu** (Şekil 1).
- 2- **Spektrofotometre:** SHIMADZU-UV-1601.
- 3- **Deiyonize su cihazı.**
- 4- **Homojenizatör:** Virtis- 23 Model.
- 5-**Su banyosu ve gerekli cam malzemeler.**

2.2.3. Kadmiyum indirgeme kolonunun hazırlanması

500 ml kadmiyum sülfat çözeltisi içeren bir erlenmayere yeterli miktarda çinko granülü konularak 7 saat süreyle bekletildi. Bu süre sonunda sıvı içeriği döküldü ve çinko granülleri iki kez 500 ml distile su ile yıkandı. Erlenmayere 200 ml distile su konularak su altında çalışmak koşuluyla çinko granülleri üzerinde biriken süngerimsi yapıdaki kadmiyum presipitatu ayrıldı. Kadmiyum içeriği karıştırıcı kabına aktarılarak su içeriği ile birlikte 5–10 saniye süreyle yüksek devirde karıştırıldı. Islak halde iken uygun elekten geçirildi. Uygun bir beherglas içerisinde aralıklarla çalkalanarak 0. 1 N HCl ile yıkandı ve asit içerisinde bir gece bırakıldı. Belirtilen işlemden sonra seyreltik asit içeriği dökülerek distile su ile yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. İndirgeme kolonunun hazırlanması için Şekil 2.2.3.1’de görülen kolonun alt ucuna küçük bir cam pamuğu yumağı yerleştirildi. Kolon distile suyla doldurulduktan sonra ortalama 12 cm yüksekliğe kadar kadmiyum katmanı oluşturacak şekilde süngerimsi kadmiyum tozu eklendi. Kolon musluğu ılımlı bir akıntı sağlayacak şekilde açılmak suretiyle kadmiyum katmanının yerleşmesi sağlandı. Daha sonra kadmiyum katmanının üst kısmına da uygun bir cam pamuğu yumağı yerleştirildi. Kolon kullanıldığı sürece distile su ile dolu tutuldu. Etkili bir indirgeme işleminin sağlanabilmesi için kolondan geçen sıvı akış hızı 4.6 ml / dakika olacak şekilde ayarlandı.



Şekil 2.2.3.1. Kadmiyum indirgeme kolonu

2.2.4. Kadmiyum indirgeme kolonun aktive edilmesi

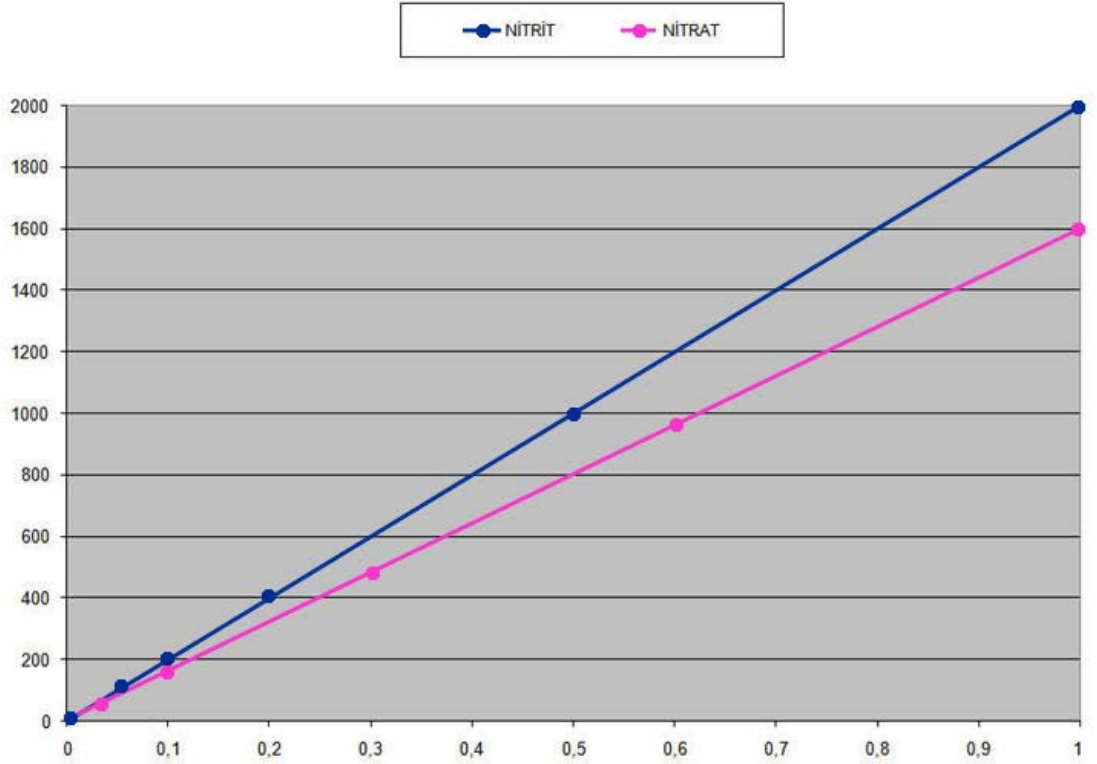
Kadmiyum indirgeme kolonunun günlük uygulamalardan önce aktive edilmesi gereklidir. Bunun için kolondan sırasıyla 2 defa 25 ml 0.1 N HCl, 2 defa 25 ml distile su ve 2 defa 25 ml amonyum klorür tampon çözeltisi geçirilir. Bu işlemlerden sonra örnekler kolondan geçirilir.

2.2.5. Nitrat ve nitrit için standart eğrinin hazırlanması

Standartların, kadmiyum kolonunun duyarlılık sınırları olan litrede 0.01 mg ile 1 mg arasında olmasına dikkat edildi. Nitrat için litrede 1 mg ve 10 mg $\text{NO}_3 - \text{N}$ olacak şekilde standartlar hazırlandı. Standartlar, 50 ml' lik son hacimde 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olacak şekilde kullanıldı ve indirgeme işlemleri yapıldı.

Nitrit içinde litrede 5 mg $\text{NO}_2 - \text{N}$ azotu olacak şekilde standart hazırlandı. Bu standarttan son 50 ml' de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olacak şekilde dilüsyonlar yapıldı.

Yöntemde numuneler için belirtilen şekilde işlemlere devam edildi. Ölçüm sonucunda elde edilen absorbanlara göre hazırlanan nitrat ve nitrit standart eğrileri Şekil-1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2.5.1. Nitrat ve nitrit standart eğrileri

Not: Nitrat ve nitrit konsantrasyonları nitrat ve nitrit azotu üzerinden verilmiştir. Absorbans değerleri 1000 ile çarpılarak yazılmıştır.

2.2.6. Nitrat ve nitrit yoğunluklarının hesaplanması

Nitrat yoğunlukları nitrat azotu olarak ve nitrit yoğunlukları nitrit azotu olarak kalibrasyon eğrilerinden hesaplandı. Analiz aşamasında ekstrakte edilen filtratın bir kısmı doğrudan nitrit ölçümü için kullanıldı ve nitrit yoğunluğu doğrudan nitrit kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Aynı filtratın bir kısmı da kadmiyum indirgeme kolonundan geçirilerek filtratın içindeki nitratın nitrite indirgenmesi sağlandı. Aynı filtratta başlangıçta ayrılarak ölçülen normal nitrit de bulunmaktadır. Bu nedenle kolondan geçirildikten sonra ölçülen nitrit yoğunluğu, toplam nitrit yoğunluğudur (nitratın indirgenmesiyle elde edilen nitrit + başlangıçta numune de bulunan nitrit). Nitrat konsantrasyonu, toplam nitrit konsantrasyonu absorbansından başlangıçtaki

nitrit konsantrasyonu absorbanası çıkartılıp, ortaya çıkan absorbananın nitrat kalibrasyon eğrisinden hesaplanmasıyla elde edildi.

2.2.7. Numunelerin ekstraksiyon ve arıtma işlemi

Numunelerden en az 5 g alınarak, havanda ezilip ufak parçalara bölündü. Ezilmiş numuneler hassas terazide 5 g olacak şekilde tartıldı. Homojenizatör kabına alınan numunelerin üzerine 35–40 ml distile su ve 0.5 ml NaOH ilave edilerek 5 dakika süreyle homojenizatörde yüksek devirde karıştırıldı. Bu karıştırma işleminden sonra pH kontrol edildi. Eğer pH değeri 7'nin altında ise pH 7–8 arasında oluncaya kadar dikkatlice % 2 NaOH solüsyonu ilave edildi. Cam balonlara aktarılan numuneler sıcak su banyosuna yerleştirilip banyonun sıcaklığı 50°C oluncaya kadar içinde tutularak belirli aralıklarla karıştırıldı. İstenilen sıcaklığa ulaşıldığında her bir numuneye 5 ml ZnSO₄ solüsyonundan ilave edilerek karıştırıldı. 10 dakika süreyle 50°C' de sıcak su banyosunda bekletildi. Bu sürenin sonunda sıcak su banyosundan oda ısısındaki soğuk su banyosuna alındı ve soğutuldu. Numunelerin hacmi distile su ilave edilerek 100 ml'ye tamamlanıp iyice karıştırıldı. 5 dakika beklenip süzgeç kâğıdından süzüldü. Bu süzüntünün ilk 20 ml'lik kısmı atıldıktan sonra süzme işlemine devam edildi. Elde edilen filtrat ile hemen aynı gün içinde analiz yapıldı.

2.2.8. Nitrit ölçümü

Örnek filtrattan 5 ml ölçülerek 50 ml'lik ölçü silindire aktarıldı. Üzerine sırayla 9 ml amonyum klorür tamponu, 5 ml % 60'luk asetik asit, 5 ml sülfanil amid, 2 ml NED ilave edildi. Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Filtrat yerine distile su kullanılarak aynı şekilde kör örneğinde hazırlandı. Hazırlanan örnek ve kör karanlık ortamda 25 dakika bekletildi. Spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda kör örneğine karşı absorbanası okundu.

2.2.9. Nitrat ölçümü

Örnek filtrattan 2 ml ölçülerek 50 ml'lik ölçü silindire aktarıldı. Üzerine 5 ml amonyum klorür tamponu ilave edilip karıştırıldı. Nitrat tayini aşamasına geçmeden önce aktive edilmiş olan kadmiyum indirgeme kolonundan 4.6 ml/dakika hızla

geçirilerek nitrat nitrite indirgendi. Her örnek filtrat kolondan geçtikten sonra 15 ml distile su ile kolon yıkandı.

Kolondan geçen numuneye sırasıyla 5 ml % 60 asetik asit, 5 ml sülfanilamid ve 2 ml NED ilave edildi. Toplam hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Filtrat yerine distile su kullanılarak aynı şekilde kör örneğide hazırlandı. Hazırlanan örnek ve kör 25 dakika karanlık ortamda bekletildi. Spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda kör örneğine karşı absorbansı okundu.

2. 3. İstatistik

Çalışma sonunda elde edilen verilerin istatistiki değerlendirmesi SPSS (13.00) istatistik paket programı ile yapıldı. Bu kapsamda, aritmetik ortalama, standart hata, en alt ve en üst değerler belirlendi. Gruplar arasındaki farklılıkların tespiti ise tek yönlü varyans analizi ve Duncan's testi ile gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

Analiz sonuçlarına göre 50 kedi mamalarının hiçbirinde aflatoksin kirliliğine rastlanmazken köpek mamalarının yerli olarak üretilen 2' sinde (2/25) 5.33 ppb ve 8 ppb, ithal olarak gelenlerin birisinde (1/25) 8 ppb düzeyinde AFB1 bulunmuştur. Buna göre köpek mamalarında aflatoksinin rastlanma sıklığı toplam 50 mama örneği diikate alındığında % 6, yerli olarak üretilenlerde %8, ithal olarak gelenlerde ise %4 olarak belirlenmiştir.

Nitrat ve nitrit yönünden analiz edilen toplam 100 kedi ve köpek kuru mamasının hepsinde çok küçük değerlerde olmak kaydıyla nitrat ve nitrit varlığı saptanmıştır. Bireysel analiz sonuçlarına göre ürün ayrımı yapılmaksızın en düşük ve en yüksek değerler bakımından incelenmesiyle nitrat yoğunluğunun 0.001–0.047 ppm ve nitrit yoğunluğunun 0.001–0.053 ppm arasında değiştiği belirlenmiştir. Böylece en düşük ve en yüksek nitrat değerleri arasında 47 ve nitrit değerleri arasında 53 kat farkın olduğu görülmüştür.

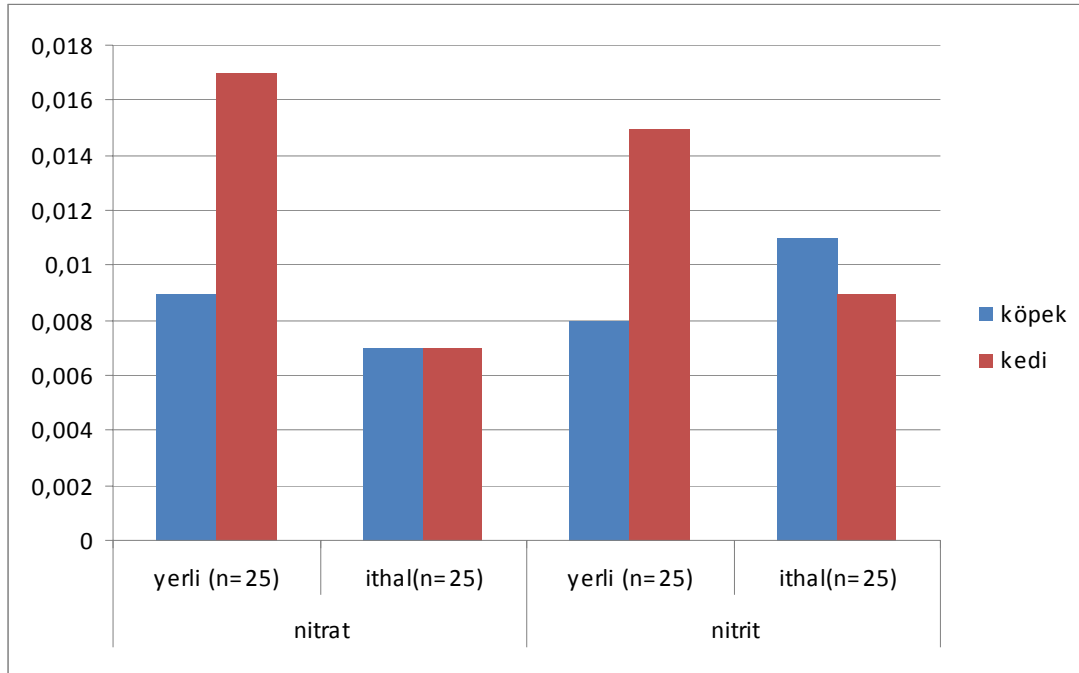
Köpek mamalarında belirlenen nitrat ve nitrit düzeylerindeki fark istatistiksel olarak önemli bulunmazken ($p>0.05$), kedi mamalarında yerli olarak üretilen mamaların nitrat ve nitrit içeriği yönünden ithal olanlardan daha yüksek olduğu ($p<0.01$) görülmüştür (Çizelge 3.1. ve Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Kedi ve köpek kuru mamalarında bulunan nitrat ve nitrit düzeyleri, en alt, üst ve ortalama (Ort± SEM) değerleri

Mama Tipi	Nitrat (ppm)		Nitrit (ppm)	
	Yerli (n=25)	İthal (n=25)	Yerli (n=25)	İthal (n=25)
Köpek	0.009 ± 0.001 ^x (0.001-0.042)	0.007 ± 0.001 (0.002-0.047)	0.008 ± 0.001 ^x (0.001-0.035)	0.011 ± 0.002 (0.002-0.053)
Kedi	0.017 ± 0.002 ^{acy} (0.003-0.043)	0.007 ± 0.001 ^{bd} (0.001-0.038)	0.015 ± 0.002 ^{cy} (0.001-0.044)	0.009 ± 0.001 ^d (0.001-0.036)

abcd: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında fark önemlidir ($p<0.01$)

xy: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0.01$)



Şekil 3.1. Kedi ve köpek kuru mamalarında bulunan nitrat ve nitrit düzeyleri (ppm)

Bireysel analiz sayısının fazla olması ve oldukça dar değer limitleri arasında dağılım göstermesi nedeniyle, nitrat-nitrit analiz sonuçlarının her birinin ayrı ayrı verilmesi yerine belli gruplarda toplanarak Çizelge 3. 2 ve Çizelge 3. 3 'te görüldüğü gibi genel aralıklarıyla ifade edilmiştir. Buna göre en düşük oranların ithal kedi kuru mamalarında, yerli olarak üretilenlerden daha yüksek sıklıkta görüldüğü, köpek kuru mamalarında ise bu sıklığın hem yerli hem ithal olanlarda neredeyse aynı olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 3. 2. Kedi kuru mamalarında belirlenen nitrat ve nitrit miktarlarının sayıca bulunma sıklığının değerlendirilmesi

Limitler ppm	Nitrat		Nitrit	
	Yerli	İthal	Yerli	İthal
0.001–0.010	7	21	9	20
0.011–0.020	11	2	10	2
0.021–0.030	4	0	2	1
0.031–0.040	2	2	3	2
0.041–0.050	1	0	1	0

Çizelge 3. 3. Köpek kuru mamalarında belirlenen nitrat ve nitrit miktarlarının sayıca bulunma sıklığının değerlendirilmesi

Limitler ppm	Nitrat		Nitrit	
	Yerli	İthal	Yerli	İthal
0.001–0.010	21	21	17	16
0.011–0.020	2	3	7	5
0.021–0.030	1	0	0	2
0.031–0.040	0	0	1	1
0.041–0.050	1	1	0	0
0.051–0.060	0	0	0	1

4.TARTIŞMA

Türkiye’ de kedi ve köpek kuru mamalarında aflatoksin kirliliği ve nitrat-nitritlerle kirliliği üzerine sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. Günsen ve ark. (2002) Haziran 2000-Haziran 2001 döneminde Türkiye’deki farklı firmalardan toplamış oldukları 18 köpek kuru maması ile 20 at yemi örneğinde yaptıkları analizlerde köpek mamalarında $<1.75-20 \mu\text{g}/\text{kg}$, at yemlerinde ise $<1.75-14 \mu\text{g}/\text{kg}$ aralıklarında AFB₁’e rastladıklarını belirtmişlerdir. Köpek mamalarının 3’ ünün (%16.7), at yemlerinden 2’ sinin (%10) 10 ppb’nin üzerinde AFB₁ içerdikleri ve en yüksek AFB₁ miktarının $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ olarak köpek mamasında bulunduğu kaydedilmiştir.

Başalan ve ark (2004) ise Türkiye’nin batı bölgelerinden toplanan 20 at ve 21 köpek kuru mamasında sırasıyla 1.98 ± 0.71 ve $6.69\pm 1.65 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁ bulunduğunu ve yasal tolerans limitlerinin altında olduğundan bunların hiçbirinin hayvanlarda risk oluşturmayacağını kaydetmişlerdir.

Köpek ve kedi yemlerinde aflatoksinler, nitrat ve nitrit içeriğine yönelik olarak Türkiye’de yapılmış bunlardan başka bir araştırmaya rastlanmamıştır. Buna göre aflatoksin içeriği yönünden karşılaştırdığımızda bu çalışmada bulunan AFB₁ değerleri Başalan ve ark. (2004)’nin sonuçlarıyla paralellik gösterirken, Günsen ve ark. (2002)’nin bulmuş oldukları değerlerden daha düşük olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada içeriğinde mısır bulunan mama örneklerinde AFB₁ bulunmuştur. Türkiye’de yapılan birçok araştırma mısırın aflatoksinler ile kirlenmiş olduğunu ortaya koymaktadır. 1993- 1995 yılları arasında Konya ve çevresinde yapılan bir çalışmada 12 mısır örneğinin 2 tanesinde 0.5 ve $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁, değişik yem örneklerinde ise $<0.1-25 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁ ve $0.5-1 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFG₂ bulunduğu bildirilmiştir (Nizamlioğlu ve ark., 1996). 1989’da yapılan başka bir çalışmada ise Türkiye’nin değişik bölgelerinden toplanan 72 mısır örneğinin % 54.2 ‘sinde aflatoksin kirliliği belirlenmiştir (Sungur ve Pamuk., 1989). 1986–1989 yılları arasında Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden 306 yem ve yem hammaddesi örneği toplayan Özkazanç ve ark., (1992) yem ve yem hammaddelerinde $1-80 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁, $10-150 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFG₁ ve $1-150 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFG₂ ve bulunduğunu bildirmişlerdir.

Kaynaklara göre (Liggett, 1986), köpeklere içeriğinde mısır bulunan yiyecekleri ile toplam $511 \mu\text{g}/\text{kg}$ miktarında AFB₁ ve AFB₂ verildiğinde sarılık, iştahsızlık ve

bitkinlik oluşabileceği belirtilmektedir. Vesonder (1991), içeriğinde aflatoksin bulunan (114 µg/kg AFB₁, 10 µg/kg AFB₂ ve 6 µg/kg AFM₁) küflü mısırın atlardaki aflatoksikozis vakalarında görülen karaciğer lezyonlarına neden olduğunu bildirmiştir.

Son 15-20 yıllık süreçte konuya ilişkin olarak ortaya konmuş bilimsel veriler işlenmiş et ürünlerine katılan nitratlı ve nitritli bileşiklerin doğrudan akut ve kronik etki yapmalarının ötesinde, oluşumuna katıldıkları nitrozamin türevleri aracılığıyla da geniş ölçekte kanserojen etki riski yarattıklarını doğrulamaktadır (Panalaks ve ark., 1973). Bunun için ev ve süs hayvanlarının yemlerinin yalnızca aflatoksinler yönünden değil, aynı zamanda nitrat-nitrit yönünden de incelenmesi gerektiği düşünülmektedir. Nitekim buna yönelik yapılan bir çalışmada Oruç ve ark. (2001) Bursa'da satılan kuş yemlerinin toplam aflatoksin, nitrat ve nitrit düzeylerine yönelik yaptıkları bir çalışmada 0.0–9.2 µg/kg toplam aflatoksin, 0.0–3.1 µg/kg nitrat ve 0.0–1.3 µg/kg nitrit bulduklarını, aflatoksin ve nitratın bulunma oranının %72.72, nitritin bulunma oranının ise %9 olduğunu bildirmişler ve sonuç olarak yem örneklerindeki toplam aflatoksin, nitrat ve nitrit düzeylerinin kuşların sağlığı açısından bir risk oluşturmayacağı kanısına varmışlardır (Oruç ve ark., 2001).

Oruç ve ark. (2001)'nin yapmış oldukları çalışma bulguları ile yapılan bu çalışma paralellik göstermektedir. Varılan sonuçlar ile aynı kanı ifade edilmiştir. Kuru mamalarda bulunan değerler benzeri şekilde kedi ve köpek sağlığı açısından herhangi bir risk oluşturmamaktadır.

Nitekim Worth ve ark. (1997), iki farklı ev ortamında yaşayan üç kedinin ölümü üzerine yaptıkları bir araştırmada kedi ve köpek mamalarına koruyucu olarak katılan sodyum nitritin ölümün nedeni olduğunu ortaya koymuşlardır. Kedilerin yapılan otopsisinde kanın rengindeki koyulaşmanın methemoglobinemi sonucu olduğu ve tükettikleri mamalarda da 2850 mg/kg miktarında toplam nitrite rastlandığını belirtmişlerdir. Kedilerin ölümünden dört gün sonra görülen benzer bir olayda da aynı marka ticari köpek mamasıyla beslenen dört köpekten ikisinin yine nitrite bağlı olarak zayıflama ve ataksi belirtileri görüldüğünü bildirmişlerdir. Kaynaklara göre Kaya ve Akar (2002), köpeklere yiyecekleri ile %2 nitrat verilmesinin zararlı olmayacağı, kedide ağızdan 30 mg/kg dozda nitritin bir saat içinde Hb'i %65

oranında mHb'e çevirebileceği ve bu durumun da kedilerin oldukça duyarlı olduklarının göstergesi olduğu bildirilmektedir.

Newman ve ark., (2007), 223-579 ppb aralıklarında AFB1 içeren ve aflatoksin kirliliği nedeniyle piyasadan geri çekilmiş köpek kuru mamalarının 9 köpeğe yedirilmesiyle yaptıkları bir çalışmada, bu çeşitten mamaları yiyen köpeklerin 6-10 hafta içerisinde 4 tanesinin öldüğünü, 5 tanesinin karaciğer yetmezliği oluştuktan sonra ötanazi edildiklerini bildirmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma, büyük şehirlerde daha yoğun olarak tercih edilen kedi ve köpek kuru mamalarındaki aflatoksinler, nitrat ve nitrit düzeylerini belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışmada 50 farklı kedi kuru mama numunesi ve 50 farklı köpek kuru mama numunesi materyal olarak kullanıldı. Örneklerde saptanan nitrat ve nitrit düzeyleri AB ve Türk mevzuatında bildirilen kriterlere uygun bulundu. Elde edilen verilere göre farklı firmalar tarafından üretilen kedi ve köpek kuru mamalarında ölçülen AFB1, nitrat ve nitrit içeriğinin hayvanlarda sağlık problemi oluşturacak düzeylerde olmadığı belirlenmiştir.

Yapılan değerlendirmede aflatoksin belirlenen numunelerden ikisinin yerli olup açık şekilde satılan kuru mamalar olduğu anlaşıldı. Açık şekilde tüketiciye sunulan mamaların fiyatının uygun olmasına rağmen kullanımının sakıncalar doğuracağı sonucuna ulaşıldı. Aflatoksin tespit edilen üçüncü kuru mamanın ise büyük paketten (15 kg) alınan numune olduğu tespit edildi. Bu durum ise paketi açıldıktan sonra özellikle büyük paketlerde saklama koşullarının önemine dikkat çekmiştir. Kirliliğin açıkta satılan kuru mamalarda oluşmasının daha sıklıkla görülebileceği saptanmıştır.

Literatür verileriyle karşılaştırıldığında, toplamış olduğumuz numunelerin analizleri sonucunda belirlediğimiz aflatoksin düzeyleri yüksek görünmemektedir. Yine de küflenme olgusuna işaret ettiği varsayılmalıdır. Çalışma sadece Ankara ili içinde sınırlı olduğu için ülke genelinde hazır mamaların depolanma koşulları da dikkate alınmalıdır. Tüketicinin ürünü aldıktan sonra kullandığı sürece uygun koşullarda saklamasının da önemi büyüktür. Kullanılan hazır kuru mamaların ağız kilitli özel paketleri mevcuttur. Her kullanımdan sonra mutlaka paketin düzgünce kapatılmış olmasına dikkat edilmelidir. Banyo, mutfak, açık balkon gibi nem ve rutubetin yoğun olacağı alanların paketlerin saklanması için uygun olmadığı tüketiciye özellikle belirtilmesi gereklidir. Hem üreticinin hem tüketicinin dikkat etmesi gereken diğer bir nokta paketlerin üzerindeki son kullanma tarihinin yakın veya geçmiş olmamasıdır. Paketlerde oluşmuş olan herhangi bir yırtık veya delinme de küflenme riskine öncülük eder. Kalitenin bozulmasında veya mevcut bir bozulma varsa hızlanmasında rol oynar. Bu sebeplerle zedelenmiş paketlerin tüketiciye sunulmaması ve tüketicinin bu paketleri tercih etmemesi önemlidir. Ürünün

kalitesinde ambalajlı veya ambalajsız koruma şeklinin de küflenme olguları üzerinde etkileri irdelenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmayla sağlanan bulguların literatür veriler ışığında değerlendirilmesiyle, Ankara ili sınırları içerisinde sağlanan ve işlenmiş et ürünü olarak kabul edilen kuru mama örneklerin hepsinde kedi ve köpek sağlığı açısından sakıncalı kabul edilebilen düzeylerde AFB1, nitrat ve nitrit varlığı saptanmamıştır. Önümüzdeki yıllarda aynı veya daha iyi bir üretim teknolojisi ve denetim yeterliliğinin devam etmesiyle bu tür ürünlerin tüketimine bağlı olarak geniş boyutlu ve sürekli bir sağlık sakıncasının risk dâhilinde olmadığı görüşüne varılmıştır.

ÖZET

Ticari Kedi ve Köpek Mamalarında Mikotoksin, Nitrat ve Nitrit Analizi

Bu çalışmanın amacı, kedi ve köpeklerin beslenmesinde kullanılan ticari mamaların içeriğinde aflatoksinler, nitrat ve nitrit düzeylerinin araştırılmasıdır.

Çalışmada birbirinden farklı 50 kedi (25' i ithal, 25' i yerli üretim) ve 50 köpek (25'i ithal, 25' i yerli üretim) maması kullanıldı. aflatoksin analizleri ince tabaka kromatografisi (İTK), nitrat-nitrit analizleri ise spektrofotometrik yöntemle yapıldı. Analiz sonuçlarına göre 50 kedi mamasının hiçbirinde aflatoksin kirliliğine rastlanmazken köpek mamalarının yerli olarak üretilen 2' sinde (2/25) 5.33 ve 8 ppb, ithal olarak gelenlerin bir tanesinde (1/25) 8 ppb düzeyinde AFB1 bulunmuştur.

Nitrat ve nitrit yönünden analiz edilen toplam 100 kedi ve köpek kuru mamasının hepsinde çok küçük değerlerde olmak kaydıyla nitrat ve nitrit varlığı saptanmıştır. Nitrat içeriği ppm olarak yerli üretim köpek mamalarında 0.009 ± 0.001 (0.001-0.042), kedi mamalarında 0.017 ± 0.002 (0.003-0.043), ithal köpek mamalarında 0.007 ± 0.001 (0.002-0.047), kedi mamalarında 0.007 ± 0.001 (0.001-0.038), nitrit içeriği yine ppm olarak yerli üretim köpek mamalarında 0.008 ± 0.001 (0.001-0.035), kedi mamalarında 0.015 ± 0.002 (0.001-0.044), ithal köpek mamalarında 0.011 ± 0.002 (0.002-0.053), kedi mamalarında 0.009 ± 0.001 (0.001-0.036) olarak ölçülmüştür. Köpek mamalarında belirlenen nitrat ve nitrit düzeylerindeki fark istatistiksel olarak önemli bulunmazken ($p>0.05$), kedi mamalarında yerli olarak üretilen mamaların nitrat ve nitrit içeriği yönünden ithal olanlardan daha yüksek olduğu ($p<0.01$) görülmüştür. Yerli olarak üretilen köpek mamaları ile ithal olarak getirilen mamaların nitrit ve nitrat içeriği arasında ise önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak Ankara'da satılan ticari kedi ve köpek mamalarında belirlenen aflatoksin B1, nitrat ve nitritin kedi ve köpeklerde herhangi bir zehirlenmeye yol açmayacak düzeyde olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Kedi, Köpek, Mama, AFB1, Nitrat, Nitrit.

SUMMARY

Mycotoxins, Nitrates and Nitrites Analyses in the Commercial Cat and Dog Food.

The aim of this study is to investigate the contamination levels of aflatoxins, nitrate and nitrite that are used in commercial cat and dog food. During the study, 50 different cat (25 of imported, 25 of local) and 50 different dog food (25 of imported, 25 of local) were used. The mycotoxin analyses have been performed, in order to determine the presence of aflatoxins has been applied to the Thin Layer Chromatography (TLC). The nitrate and nitrite concentrations in the food have been measured by spectrophotometric methods. According to the results of analyses none of the 50 pieces cat food have been found mycotoxin contamination. In 2 samples which product local (2/25) 5.33 and 8 ppb, in 1 sample which were imported (1/25) 8 ppb AFB1 was found.

Little quantities have been determined in total 100 samples in the cat and dog food in terms of nitrate and nitrite contamination. Nitrate content of local dog food as ppm 0.009 ± 0.001 (0.001-0.042), in cat food 0.017 ± 0.002 (0.003-0.043), in imported dog food 0.007 ± 0.001 (0.002-0.047), in cat food 0.007 ± 0.001 (0.001-0.038), nitrite content as ppm in local dog food 0.008 ± 0.001 (0.001-0.035), in cat food 0.015 ± 0.002 (0.001-0.044), in imported dog food 0.011 ± 0.002 (0.002-0.053), in cat food 0.009 ± 0.001 (0.001-0.036) have been measured. While the statistical determination of the dog food nitrate and nitrite differences was not important ($p > 0.05$), the nitrate and nitrite content of the local product cat food have higher than the imported samples ($p < 0.01$). Between the nitrate and nitrite content of local and imported dog food differences have not been found important statistically ($p > 0.05$).

According to the results , aflatoxins, the nitrite and nitrate contaminations determined in the dog and cat food were found to be not causing to the toxication for cats and dogs.

Key Words: Cat , Dog, Food, AFB1, Nitrate and Nitrite

KAYNAKLAR

- AĞAOĞLU, S., ALEMDAR, S., KAHRAMAN, T. (2002). Ton balık konservelerinde nitrat ve nitrit düzeyleri. *Y.Y. Ü. Vet. Fak. Derg.* **13(1-2): 95-97.**
- AKKILIÇ, M. ve SÜRME, S. (1979). Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Laboratuar Kitabı. *A. Ü. Vet. Fak. Yayın No: 255.*
- AKYILDIZ, R. (1968): Yemler Bilgisi Laboratuar Kılavuzu. *A. Ü. Ziraat Fak. Yayın No: 358; VII+214.*
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). (1992). Standart methods of water and waste water. *18th ed., Am. Public Health Association, American Water Works Association, Water Environ. Fed. Pub., Washington D.C.*
- ANKLAM, E. STROKA, J. (2002). The European perspective of mycotoxins and food safety. In Int. Workshop on Mycotoxin. *FDA and JIFSAN, University of Maryland, USA. July, 22-26.*
- ANONİM. (1979). Aflatoxin and other mycotoxins: An agricultural perspective. *Council for Agricultural Science and Technology Report No: 80.*
- ANONİM. (1988). Kutulanmış balık konserveleri genel esasları. TS 353/Mart, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- ANONİM. (1996). Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. *17th ed., APHA, AWWA, WPCF, p: (4-87, 4-94).*
- ANONİM (1996). Nitrite in Meat Curing. Risks and Benefits. *Council for Agricultural Science and Technology Report No: 74, March 6, USDA, USA.*
- ANONİM (2003). CAST releases mycotoxin assessment report. *Feedstuffs January 6 : 9-19.*
- ANONİM (2005). Yemlerde istenmeyen maddeler hakkında tebliğ. 5.02.2005 tarih ve 25718 sayılı Resmi Gazete.
- ARAN, N. (1993). Gıda Sanayinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları, Marmara Araştırma Merkezi, Gıda ve Soğutma Teknolojileri Bölümü, Gebze, Kocaeli, **124, 2005–2006.**
- BARTIK, M., PISKAC, A. (1981). Veterinary Toxicology. *Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-Newyork, 47–59.*
- BASTIANELLO, S. S., NESBIT, J. W., WILLIAM, M. C., LANGE, A. L. (1987). Pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. *Onderstepoort J Vet. Res.* **54(4): 635-640.**

- BAŞALAN, M., HİSMİOĞULLARI, S. E., HİSMİOĞULLARI, A. A., FİLAZİ, A. (2004). Fungi and aflatoxin B₁ in horse and dog feeds in Western Turkey. *Revue Med. Vet.* **156(5): 248-252.**
- BELJAARS, P.R., VAN DIJK, R., VAN DER HORST, G.M. (1994). Determination of nitrate in vegetables by continuous flow: *Interlaboratory Study. J.A.O.A.C.*, **77(6): 1522-1530.**
- BHAT, R.V., VASANTHĪ, S. (2003). Mycotoxin food safety risk in developing countries. *Focus*, **10: 3-7.**
- BINGHAM, A. K., HUEBNER, H. J., PHILLIPS, T. D., BAUER, J. E. (2004). Identification and reduction of urinary aflatoxin metabolites in dogs. *Food Chem Toxicol.* **42:1851-1858.**
- BOERMANS, H.J. (1990). Diagnosis of nitrate toxicosis in cattle, using biological fluids and a rapid ion chromatographic method. *Am. J. Vet. Res.*, **51(3): 491-495.**
- BONWICK, G. A. and SMITH, C. J. (2004). Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int. J. food Sci. Tech.* **39: 817-827.**
- BOZOĞLU, F. (2005). Mikotoksin analiz yöntemlerindeki gelişmeler, floresans polarizasyon immunoassay (FPIA). II. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiri Kitabı. Mtis, İstanbul.* **26-33, 23-24.**
- BRUNNING-FANN, C.S., KANEENE, J.B.(1993a). The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on animal health. *Vet. Human Toxicol.* **35(3): 237–253.**
- BRUNNING-FANN, C.S., KANEENE, J.B. (1993b). The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health : *A Review. Vet. Human Toxicol.*, **35(6): 521-538.**
- BUCK, W.B. (1970a). Laboratory toxicologic tests and their interpretation. *J. A. V. M. A.* **155: 1928–1941.**
- BUCK, W. B. (1970b). Diagnosis of feed-relate toxicoses *J. A. V. M. A.* **156: 1434–1443.**
- BUCK, W.B., OSWEILER, G.D. and VANGELDER, G.A. (1976). Nitrates, nitrites and related problems. *In: VANGELDER, G.A., Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology. 2nd ed., dubuque, Iowa Kendall/Hunt Publishing Co., pp. 109-115.*

- CARLSON, M.P., SCHNEIDER, N. R. (1986). Determination of nitrate in forages by using selective ion electrode: *Collaborative Study. J.A.O.A.C.*, **69(2): 196-198.**
- CEYLAN, S. (1998). Temel Veteriner Toksikoloji. *U. Ü. Veteriner Fakültesi, Bursa.*
- COWLEY, C.D., COLLINGS.D.F. (1977). Nitrate poisoning. *Vet.Rec.*, **101: 305-306.**
- ÇAKMAKÇI, S., ÇELİK, İ. (1995). Gıda Katkı Maddeleri. *Atatürk Üniversitesi Zir. Fak. Ofset Tesisi, 2. Baskı, Erzurum.*
- DEEB, B.S. and SLOAN, K.W. (1975). Nitrates, Nitrites and Health. *Kansas State College of Agriculture and Applied Science, Urbana-Champaign, Illinois, USA.*, **52 pp.**
- DİNÇER, B. (1995). Et Ürünleri Teknolojisinde Sanitasyon ve Sanitasyon Hizmetleri. *Ders Notları. A. Ü. Vet. Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.*
- DOLLAHITE, J. W. and HOLT, E. C. (1970). Nitrate poisoning . *S. Afr. Med. J.* **44: 171-174.**
- EDGEELL, K.W., LONGBOTTOM, J.E., PFAFF, J.D. (1994). Determination of inorganic anions in water by ion chromatography: *Collaborative Study. J.A.O.A.C.*, **77(5): 1253-1263.**
- ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 5. (1977). Nitrates, nitrites ang N-nitroso compounds. *WHO Geneva.*
- FINK-GREMMELS, J., (1999): Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Vet. Quart.*, **21(4): 115-120.**
- GEURINK, S. H., MALESTEIN, A. KEMP, A. and KLOOSTER, A. TH. VANT. (1979). Nitrate poisoning in cattle. 3. The relationship between nitrate in take with hay or fresh roughage and the speed of in take on the formantion of methemoglobin. *Net. J. Agric. Sci.* **30: 105-113.**
- GEURINK, S. H., MALESTEIN, A., KEMP, A., KORZENIOWSKI, A. and VAN'T KLOOSTER, A.T. (1982). Nitrate poisoning in cattle 7 prevention. *Neth J. Agric. Sci.* **30: 105-113.**
- GREENE, C. E., BARSANTI, J. A., JONES, B. D. (1977). Dissaminated intravascular coagulation complicating aflatoxicosis in dogs. *Cornell Vet.* **67 (1): 29-49.**
- GUNSEN, U., ve YAROĞLU, T. (2002). Aflatoxin in Dog and Horse Feeds in Turkey. *Vet. Hum. Toxicol. April;* **44(2): 113-114.**

- HAGIWARA, M. K., KOGIKA, M. M., MALUCELLI, B. E. (1990). Disseminated intravascular coagulation in dogs with aflatoxicosis. *J Small Anim Pract.* **31**, 239-243.
- HALL, A.H., RUMACK, B.H. (1997). Hydrogen sulfide poisoning: An antidotal role for sodium nitrite? *Vet. Human Toxicol.*, **39(3)**: 152-154.
- HATCH, R.C. (1987). Poisons causing respiratory insufficiency. *In. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Erds Sooth, N. H. and Mcdonald, L. E. Sixth ed., Iowa State University Pres/Ames pp.* **1001–1131**.
- HIBBS, C.M., STENCEL, E.L., HILL, R.M. (1978). Nitrate toxicosis in cattle. *Vet. Human Toxicol.*, **20**: 1-2.
- HORIO, M. (1982): Poisoning in ruminants. 1. Changes in methaemoglobin formation and some medico-chemical properties of goats after administration with KNO₃. *Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College* **31**: 75–87.
- HOUSE, C.(1990). *Modification makes mycotoxins aissay more user friendly, Feedstuffs, December* **24**.
- HYDE, W., KIESEY, J., ROSS, P.F., STAHR, H.M. (1977). Analytical Toxicology Methods Manual. *Iowa State University Press.* **68 - 67**.
- JONES, D.I.H. and GRIFFITH, G. (1965). Reduction of nitrate to nitrite in mosit feeds. *J. Sci. Food Agric.*, **721-725**.
- JUSZKIEWICZ, T., PISKORSA-PLISZCZYNSKA, J. (1992). Occurrence of mycotoxins in animal feeds. *J. environ. Toxicol. Oncol.*, **11(4)**: 211-215.
- KAYA, S. (1984a). Yem ve yem hammaddeleri ile bazı biyolojik sıvılarda nitrat ve nitrit analizi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **31(1)**: 15-27.
- KAYA, S., (1984b): Mikotoksinler. Hayvan ve insan sağlığı yönünden önemi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **31(3)**: 388-409.
- KAYA, S. (2002). *Mikotoksinler*: **537-573**. Alınmıştır: Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A. (Editörler). *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Medisan Yayın Serisi* **53, 2. Baskı, Ankara**.
- KAYA, S., AKAR, F. (2002). *İnorganik maddeler*. **240-245**. Alınmıştır: Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A. (Editörler). *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Medisan Yayın Serisi* **53, 2. Baskı, Ankara**.
- KAYA, S., ŞANLI, Y., YARSAN, E., ÖZSOY, A., AKKAYA, R., BİLGİLİ, A. (1996). Çok yönlü hayvan yetiştiriciliğinde karma yem ve yem

hammaddelerinden kaynaklanan olumsuzluk faktörlerinin araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **8(4): 59–80.**

KEMP, A., GEURINK, J. H., HAALSTRA, R. T. and MALESTEIN, A. (1977). Nitrate poisoning in cattle 2. Changes in nitrite in Rumen fluid and methaemoglobin formation in blood after high nitrate intake *Neth. J. Agric. Sci.* **25: 51–62.**

KRISHNAMACHARI, K. A., BHAT, R. V., NAGARAJAN, V., TILAK, T. B. (1975). Hepatitis due to aflatoxicosis. *An outbreak in Western India. Lancet.* **10; 1(7915): 1061–3.**

LEE, C., WEISS, R. and HORVATH, D.J. (1970). Effects of nitrogen fertilization on the thyroid function of raste fed 40% orchard grass diets *J. Nutr.* **100: 1121–1126.**

LIGGETT, A. D., COLVIN, B. M., BEAVER, R. W. (1986). Canine aflatoxicosis: a continuing problem. *Vet. Hum. Toxicol.* **28: 428-430.**

MARQUARDT, R.R. and FROHLICH, A.A. (1992). A Review of Recent Advances in Understanding Ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* **70: 3968-3988.**

NAKAMURA, Y., TADA, Y., SHIBUYA, H. YOSHIDA, J. and HAKAMURA, R. (1979). The influence of concentrates on the nitrate metabolism of microorganisms in the Rumen of sheep *Jap. J. Zootech. Sci.* **50: 782–789.**

NASIR, M. S. and JOLLEY, M. E. (2003). Fluorescence Polarization (FP) Assays for the determination of Grain Mycotoxins (Fumonisin, DON Vomitoxin and Aflatoxins). *Comb. Chem. High T. Scr.* **6: 267-273.**

NEWMAN, S. J., SMITH, J. R., STENSKE, K. A., NEWMAN, L. B., DUNLAP, J. R., IMERMAN, P. M., KIRK, C. A. (2007). Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19: 168-175.**

NİZAMLIOĞLU, F. (1996). Mikotoksin şüphesiyle laboratuara getirilen yem ve yem hammaddelerinde aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ araştırılması. *Veterinarium* **7: 42-45.**

OMINSK, K.H., MARQUARD, R.R., SINHA, R.N., ABRAMSON, A. (1994). Ecological Aspects of Growth and Mycotoxin Production by Storage Fungi: **287-312.**

ORUÇ, H. H. (2005): Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* **24, 1-2-3-4: 105-110.**

ORUÇ, H. H., SONAL, S., CEYLAN, S. (2001). Kuş yemlerinde total aflatoksin, nitrat ve nitrit. *J. Fac. Vet. Med.* **20: 35-38.**

- OSWEILER, G.D., CARSON, T.L., BUCK, W.B., VAN GELDER, G.A. (1985). Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology, 3rd ed., Kendall-Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa, **460-466**.
- ÖZKAZANÇ, A., N., RUSSEL-SİN, H., ŞANLI, Y. (1992). Türkiye'nin değişik bölgelerinde üretilen karma yem ve yem hammaddelerinin mikotoksinlerle kirlenme durumunun incelenmesi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **39**: 268–290.
- ÖZPINAR, H. (1995). At Beslemesi. *İstanbul Üniv. Vet. Fak., İstanbul. Omaş Ofset A.Ş.* **57–59**.
- PANALAKS, T., IYENGAR, J.R. and SEN, N.P.(1973). Nitrate, nitrite and dimethynirosamine in cured meat products. *J. A. O. A. C.* **56(3)**: 621–624.
- PARK, D. (2002). Mycotoxin control-regulations. *In Int. Workshop on Mycotoxin. FDA and JIFSAN; University of Maryland, USA. July*, **22-26**.
- PENIDO MAIA, P. and PEREIRA BASTOS DE SIQUEIRA, M. E. (2002). Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in some Brazilian pet foods. *Food Addit. Contam.*, **19(12)**, 1180-1183.
- PHILLIPS, W.E.J. (1968). Changes in the nitrate and nitrite contents of fresh and processed spinach during storage. *J. Agric. Food Chem.*, **16**: 88-91.
- QUIST, C. F., BOUNOUS, D. I., KILBURN, J. V., NETTLES, V.F., WYATT, R. D. (2000). The effects of dietary aflatoxin on wild turkey poults. *Journal of Wildlife Diseases*, **36(3)**: 436-444.
- RASBY, R., ANDERSON, B., SCHNIDER, N. (1996). Nitrates in livestock feeding. NebGuide. *Cooperative Extension*, **G-74-170-A13**.
- RIDDER, W. E. and OEHME, F. W. (1974). Nitrates as an environmental, animal and human hazard. *Clin. Tox.* **7**: 145–159.
- ROBERTSON, B.A. and PATTERSON, D.S.P. (1979). Mycotoxins in animal feedstuffs: Sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone and T-2 toxin. *J.A.O.A.C.* **62**: 1265–1267.
- SALDAMLI, İ. (1998). Gıda Kimyası. *Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.* s: **527**
- SCHNEIDER, N.R., YEARY, R.A. (1975). Nitrite and nitrate pharmacokinetics in the dog, sheep and pony. *Am. J. Vet. Res.*, **36(7)**: 941-947.
- SCHNEIDER, N.R., YEARY, R.A. (1997). Measurement of nitrite and nitrate in blood. *Am. J. Vet. Res.*, **34(1)**: 133-135.

- SEN, N.P., DONALDSON, B. (1978). Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods. *J.A.O.A.C.*, **61(6)**: 1389-1394.
- SHIM, W. B., KOLOSAWA, A. Y., KIM, Y. J., YANG, Z. Y., PARK, S. J., EREMIN, S. A., LEE, I. S., CHUNG, D. H. (2004). Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A. *Int. J. Food Sci. Tech.* **39** : 829-837.
- SIRIWORDENE, M. G. (1977). Le probleme des artefact le dosage. *Archives de L'Institut Pasteur de Tunis*, **54**: 405-409.
- STENSKE, K. A., SMITH, J. R., NEWMAN, S. J., NEWMAN, L. B., KIRK, C. A. (2006). Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *J.A.V.M.A.*, **1686-1691**.
- SUNGUR, S., PAMUK, F. (1989). Türkiye'nin değişik bölgelerinden temin edilen mısır örneklerinde aflatoksin tayini. *Tur. Hij. Der. Biyol. Derg.* **46**: 69-75.
- ŞANLI, Y. (1995). Mikotoksinler: **283-328**, Alınmıştır. KAYA, S. (Editör), *Veteriner Klinik Toksikoloji, Medisan. Ankara*.
- ŞANLI, Y., CEYLAN, S., KAYA, S. (1982a). Karma yemlerde aflatoksin analizi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **29, (1-2)**: 50-70.
- ŞANLI, Y., CEYLAN, S., KAYA, S. (1982b). Tavuk yemlerinde ve yem ilkel maddelerinde aflatoksinler. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* **29, (3-4)**: 473-492.
- TAYLOR, D. (2001). New research on mineral adsorbents. *Feed Management* **62, 19-22**.
- THE MERCK VETERINARY MANUAL. (1998). Nitrate and nitrite poisoning. *8th ed.*, National Publishing Inc., Philadelphia, Pennsylvania, **2091-2094**.
- USHER, C. D. and TELLIN, G. M. (1975). Analysis of nitrate and nitrite in feedstuffs. *A Critical Review. J. Sci. Food. Agric.*, **2**: 1973-1805.
- VERMUT, J. and VISSER, R. (1987). Nitrate toxicity in cattle. *N. Z. Vet. J.* **136-137**.
- VESONDER, R., HALIBURTON, J., STUBBLEFIELD, R. (1991). *Aspergillus flavus* and aflatoksins B₁, B₂ and M₁ in corn associated with equine death. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**: 151-153.
- WATANABE, F., HOSOYA, H., KUWABARA, Y., NOMOTO, S. (1973). Studies on nitrate and nitrite poisoning in dairy cattle: IV. Relation of nitrate and nitrite in body fluid composition. *Bull. Coll. Agric. Vet. Med. Nihon. Univ.*, **30**: 182-197.

- WORTH, A. J., AINSWORTH, S. J., BROCKLEHURST, P. J., COLLETT, M. G. (1997). Nitrite poisoning in cats and dogs fed a commercial pet food. *N.Z. Vet. J.*, **45**: 193-195.
- YAVUZ, H. (1992). Türkiye’de üretilen karma yem ve yem hammaddelerindeki nitrat ve nitrit içeriğinin çeşitli faktörlere göre değişimi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **39(1-2):93-113**.
- YERUHAM, I., SHLOSBERG, A., HANJI, V., BELLAICHE, M., MARCUS, M., LIBERBOIM, M.(1997). Nitrate toxicosis in beef and dairy cattle herds due to contamination of drinking water and whey. *Vet. Human Toxicol.*, **39(5): 296-298**.
- YÜCEL, A., ÇAĞIŞ, N. (1987). Et teknolojisinde nitrat ve nitritin rolü ve halk sağığı yönünden önemi. *Et ve Balık Endüstrisi Derg.* **7(40): 27-34**.

ÖZGEÇMİŞ**I- Bireysel Bilgiler**

Adı	Ülkü Kamile
Soyadı	BECER
Doğum yeri ve tarihi	Çankırı / 1976
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu	Bekar
İletişim adresi ve telefonu	Çetin Emeç Bulvarı 61.Sokak 7/11 Balgat /ANKARA ulkubecer@hotmail.com Telefonu: 0 532 654 36 33 0 (312) 286 16 65

II- Eğitim

Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (1995-2002)
Orta Öğrenim	Ankara/ TED Ankara Koleji (1987-1994)
İlk Öğrenim	Ankara /Mimar Kemal İlk Öğretim Okulu (1981-1987)
Yabancı Dil	İyi düzeyde İngilizce

III- Unvanlar**IV- Mesleki Deneyim**

2002 yılı itibariyle özel sektörde halen Veteriner Hekimlik yapmaktayım.