

Mısır Silajında Aflatoksin B₁ ve Zearalenon Kirliliklerinin Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)-Florodansitometrik Yöntemle Belirlenmesi ^{[1][2]}

Hasan AYDIN *  Halis OĞUZ **

[1] Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No 08202004)

[2] Bu araştırma "İç Anadolu Bölgesi illerinden toplanan mısır silajı örneklerinde aflatoksin ve zearalenon kirliliklerinin belirlenmesi" adlı doktora tezinden özetlenmiştir

* Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü, Toksikoloji Laboratuvarı, TR-42080 Konya - TÜRKİYE

** Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, TR-42075 Konya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-5266

Özet

Bu çalışmada mısır silajında aflatoksin B₁ (AFB₁) ve zearalenon (ZON) kirliliklerinin analizinde Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisinde (HPTLC) Florodansitometre ile yemlerde kullanılan yöntemin modifiye edilerek silajlarda rutin olarak kullanılması ve bu yöntem ile İç Anadolu Bölgesi illerinden toplanan mısır silajı örneklerinde bu kirliliklerin belirlenmesi amaçlandı. Mısır silajında AFB₁ ve ZON miktarının tayininde kullanılan metotların validasyonu için özgünlük, doğrusalılık, geri kazanım, duyarlılık ve kesinlik parametreleri çalışıldı. Mikotoksin analizlerinde duyarlılık limitleri AFB₁ için 2 ppb, ZON için 12 ppb; geri kazanım AFB₁ için %74, ZON için %81 olarak belirlendi. Mısır silajında AFB₁ analizinde developman çözültisi olarak kloroform + aseton + bidistile su kullanıldı. ZON analizinde ise TLC plakaların yerine HPTLC plakalar kullanıldı. Aksaray, Ankara, Çankırı, Eskişehir, Karaman, Kayseri, Kırıkkale, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Niğde, Sivas, Yozgat'taki süt sığırcılığı ve koyunculuk işletmelerinden 1 Mart - 31 Mayıs 2008 tarihlerinde 2007 yılının ürünü olan toplam 260 mısır silajı örneği toplandı ve örneklerde AFB₁ ve ZON düzeyleri belirlendi. Mısır silajlarında AFB₁ ve ZON düzeylerini tespit eden geçerliliği denenmiş bu yöntemlerin rutin analizlerde laboratuvarlarda kullanılabileceği belirlendi. Toksikolojik analizler sonucunda mısır silajı örneklerinin hiçbirinde AFB₁ ve ZON kirliliği tespit edilemedi.

Anahtar sözcükler: Mısır Silajı, Aflatoksin B₁, Zearalenon, HPTLC, Florodansitometre

Analyzes of Aflatoxin B₁ and Zearalenone in Corn Silage by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-Fluorodensitometric Method

Summary

In this study development of experimented and verified method available for routine analyzes of aflatoxin B₁ (AFB₁) and zearalenone (ZON) contamination in corn silage by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-Fluorodensitometric method; and determination of contamination in corn silage samples collected from all of the Central Anatolia provinces by this method were aimed. The validation of both methods used in AFB₁ and ZON analyses was performed by the parameters of specificity, linearity, recovery, sensitivity and precision. In the mycotoxin analyses, the limits of sensitivity were determined 2 ppb for AFB₁ and 12 ppb for ZON. The recovery was 74% AFB₁ and 81% for ZON in corn silage. Chloroform + methanol + water development solution was used for AFB₁ analyses; and HPTLC plates were used instead of TLC plates in ZON analyses. A total of 260 corn silage samples which were the crops of the year 2007 were collected in the dairy cattle and sheep enterprises in the provinces of Aksaray, Ankara, Çankırı, Eskişehir, Karaman, Kayseri, Kırıkkale, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Niğde, Sivas and Yozgat in Central Anatolia-Turkey between the dates of March 1 and May 31, 2008; and AFB₁ and ZON levels in collected corn silage samples were analyzed. The tested and verified methods whose effectiveness was experimented on the silage samples were determined in laboratories for routine analyzes. The result of toxicological analyzes, AFB₁ and ZON contamination were not detected in any of the silage samples.

Keywords: Corn silage, Aflatoxin B₁, Zearalenone, HPTLC, Fluorodensitometry



İletişim (Correspondence)



+90 332 3224741/148



hasanaydin72@hotmail.com

GİRİŞ

Mikotoksinler, üretimi ve depolanması uygun şartlarda yapılamayan yem, yem hammaddeleri ve besinlerde kontaminasyona sebep olan mantarlar tarafından salgılanan sekonder toksik metabolitlerdir ^{1,2}. *Fusarium*, *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri silajlarda mikotoksin üreten mantarlardan en önemlileridir ³⁻⁵. Bunlar aflatoksin (AF)'ler ve zearalenon (ZON) da dahil birçok mikotoksini üretebilmektedirler. Mikotoksinler içerisinde en önemlisi AF'dir ³. Çünkü diğerlerine oranla daha toksik olup daha kısa sürede oluşmaktadır ⁶. Bu tür toksinler tüm hayvan türleri ve insanlarda zehirlenmeye neden olmakta; her çeşit yem ile besin maddelerinde bulunabilmekte ve karsinojenite riskleri diğer mikotoksinlere göre daha fazla olmaktadır ^{5,7}. AF'ler; *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) türü mantarlar tarafından üretilen toksik metabolitlerdir ^{8,9}. Besin ve çevre şartları müsaitse (20-30°C) bu tür mantarların AF oluşturması için 3-6 günlük bir süre yeterli olmaktadır ¹⁰. AF'ler kimyasal olarak difurokumarolakton olarak sınıflandırılmaktadır ¹¹.

Fenolik rezorsilik asit türevi, büyük lakton yapılı ZON (F-2 toksin) *Fusarium cerealis*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. roseum*, *F. graminearum* ¹¹⁻¹⁴, *F. culmorum* ^{15,16}, *F. crookwellense* ¹⁷, *F. moniliforme* ¹⁸, *F. verticillioides* ¹⁹ gibi *Fusarium* türleri tarafından üretilen, güçlü östrojenik bir mikotoksindir ²⁰. Tahılların, yem ve yem hammaddelerinin 24-27°C'de yüksek rutubetli ortamlarda depolanması ZON sentezini teşvik etmektedir. ZON son derece dayanıklı bir mikotoksindir; ısıtma ve diğer işlemlerden fazla etkilenmemektedir ²¹. Soğuk ve nem oranının yüksek olduğu mevsimlerde yetiştirilen ve hasat edilen tarım ürünleri ile silajlarda rastlanılmıştır ²².

Türkiye'de yemlerde bulunmasına izin verilen AFB₁ ve ZON düzeyleri Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı tarafından, 27653 ve 27714 sayılı Resmi Gazetelerde yayınlanan Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ'de bildirilmiştir. Bu tebliğlere göre yem maddesi olan silajda AFB₁'in 20 ppb'ye ve ZON'un ise 0.5 ppm'e kadar bulunmasına izin verilmektedir ^{23,24}.

Silaj yapımı dünyada olduğu gibi Türkiye'de de hayvan besleme alanında en sık kullanılan depolama yöntemlerinden birisidir. Usulüne uygun olarak yapılmayan silajlar, mikotoksin üreten mantarlar için uygun bir üreme ortamı oluşturabilmektedir. Bu nedenle silajların tekniğine uygun şekilde hazırlanması ve belli aralıklarla toksikolojik analizlerinin yapılması gerekmektedir. Mikotoksin zehirlenmeleri genellikle kronik seyirli olması nedeniyle klinik belirtiler oldukça geç ortaya çıkmakta ve yetiştiriciler tarafından kolaylıkla fark edilememektedir. Bu nedenle yetiştiriciler yem maddesinin rutin kontrolünü ihmal etmekte ve genellikle sağlık problemleri çıktıktan sonra çözüm aramaktadırlar. Özellikle süt sığıru yetiştiriciliğinde görülen jinekolojik problemler bu konunun önemini daha da artırmaktadır.

Türkiye'de ve özellikle silajın yaygın olarak yapıldığı İç Anadolu Bölgesinde AFB₁ ve ZON gibi mikotoksinlerin silajlardaki durumu ile ilgili ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır. Sunulan bu çalışma ile, İç Anadolu Bölgesi illerinden toplanan silaj örneklerinde; AFB₁ ve ZON düzeylerinin tespiti ve geçerliliği denenmiş yöntemlerin rutin analizlerde kullanılabilir hale getirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Etik Kurulu Onayı

Bu proje Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun 08.10.2007 tarihli 2007/053 karar sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Metot Validasyonu

Her iki analiz için metot validasyonunun belirlenmesinde performans ölçütleri olarak özgünlük, doğrusalılık (ölçüm aralığı), geri kazanım, duyarlılık (tespit sınırı ve ölçülebilirlik sınırı) ve kesinlik alındı ^{25,26}.

AFB₁ Analizi

AFB₁ analizleri Kamimura ve ark.'nın ²⁷ belirtmiş oldukları yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirildi.

AFB₁ Ekstraksiyonu: Etüvde kurutulmuş silaj örneklerinden 20 g tartılıp öğütüldü. Cam şişelere konulan silaj örneği üzerine 100 ml kloroform ve 10 ml distile su ilave edildi. Ağız kapatılarak 10 dk süreyle çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra 10 g Na₂SO₄ konmuş süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen ekstraktdan 50 ml'si kolon kromatografisi için ayrıldı.

AFB₁ Kolon Kromatografisinde Temizleme İşlemi: Cam kolonun tabanına cam pamuğu yerleştirildi. Üzerine 5 ml kloroform aktarıldı. Önce 5 g susuz granüllü Na₂SO₄, sonra 0.7 g florosil ve tekrar 0.5 g susuz granüllü Na₂SO₄ konularak kolon hazırlandı. Daha önce ayrılan 50 ml ekstraktın hepsi bu kolona döküldü. Sırasıyla 30 ml kloroform + n-hekzan (1+1) ve 20 ml kloroform + metanol (9+1) ile yıkama işlemi yapıldı. 30 ml aseton + bidistile su (9+1) ile AFB₁ elüsyon örnekleri potaya alındı. Benmaride 50°C'de kuruyuncaya kadar uçuruldu. İki kere 1'er ml asetonla çözümlenerek tüpe alınıp tekrar uçuruldu.

AFB₁ İnce Tabaka Kromatografisinde Plakaya Lekelerin Uygulanması: Elde edilen AFB₁ eluatı 200 µl benzen + asetonitril (98+2)'de çözdürüldü. Spot uygulama düzeneği olan Linomat 5 ile HPTLC plakasının altından 11 cm uygulama noktası seçilerek 20 µl örnek plakaya uygulandı. Örnek uygulama yerinden 15 mm aralıkla 0.5 µg/ml'lik AFB₁ çalışma standardından 20 µl (10 ng) uygulandı.

AFB₁ Developman Sistemi: Kirliliklerden arındırmak için susuz dietileterde ters developman yapıldı. Plaka önce developman tankında dietileterde sonuna kadar yürütüldü.

Tanktan çıkarılıp havada kurutuldu. Yürütme yönünün tersi istikametinden ve uygulama noktasının 1 cm altından plaka makasla kesildi^{5,28}. İkinci developman AMD 2'de modifiye edilerek kloroform+aseton+bidistile su (88+12+0.1) karışımında 90 mm yürütülerek gerçekleştirildi. AFB₁ analizinde developman çözeltisi olarak kloroform + aseton + bidistile su (88+12+0,1) kullanılarak R_f değeri artırılmıştır.

AFB₁'in Miktar Tayini: AFB₁'in kantitatif tayini HPTLC plaka kullanılarak florodansitometrede 366 nm dalga boyunda, Hg lambada, floresans ölçüm modunda, K400 optik filtrede gerçekleştirildi.

AFB₁ Doğrulama Testi: Doğrulama testi için HPTLC plakalara %25'lik H₂SO₄ püskürtüldü. 366 nm dalga boyu ışık altında plakalardaki mavi-yeşil renkten sarıya dönen lekeler müspet kabul edildi²⁹.

ZON Analizi

ZON analizi Lepom'un³⁰ bildirmiş olduğu yöntemle gerçekleştirildi.

Ekstraksiyon ve Minikolon Kromatografisinde Temizleme İşlemi: Etüvde kurutulmuş silaj örneklerinden 50 g tartıldıktan sonra öğütülerek cam şişelere konuldu. Üzerine 20 ml bidistile su ve 200 ml kloroform + metanol (9+1) karışımı eklenerek 60 dk çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen filtratın 50 ml'si ayırma hunisine alındı. Üzerine 50 ml %4'lük NaOH eklenerek 1 dk süreyle karıştırıldı. Kloroform fazı atıldı. Alkali çözelti 25 ml kloroform ile yıkandı. Sulu faz alınarak 0.7 M fosforik asitle pH'sı 8 olacak şekilde tamponlandı. İki kez 50 ml kloroform ile ekstrakte edildi. Birleştirilen kloroform ekstraktları susuz NaSO₄'dan süzüldü. Ekstraktın 80 ml'si alınarak uçuruldu. Süzgeç kağıdı 2 ml'lik enjektörün tabanına yerleştirildikten sonra 1 g silika jel-60 enjektör içine doldurularak minikolon hazırlandı. Uçurulan ekstrakt 3x200 µl kloroform ile minikolona aktarıldı. Solüsyonun buharlaşmasından sonra 10 ml'lik enjektörle minikolon 5-7 ml/dk akış hızında 5 ml toluen ile yıkandı. Minikolondan toluen + aseton (9+1) karışımından 15 ml akıtılarak eluat elde edildi. Eluat uçurularak kurutuldu.

İnce Tabaka Kromatografisinde Plakaya Lekelerin Uygulanması ve Developman Sistemi: Eluat 0.5 ml kloroformla çözüldü. Uygulama düzeneği olan Linomat 5 ile HPTLC plakanın (10x20 cm'lik) alttan 1 cm uygulama noktası seçilerek 1 µl örnek plakaya uygulandı. Örnek uygulama yerinden 15 mm uzaklığa 5 µg/ml'lik ZON çalışma standardından 10 µl (50 ng) uygulandı. Yöntem modifiye edilerek TLC plakanın yerine HPTLC plaka kullanılarak AMD 2'de kloroform + metanol (97+3) karışımında 90 mm yürütüldü. Analizde HPTLC plakaların kullanımı ile daha az miktarda developman çözeltisi kullanılmıştır.

Miktar Tayini ve Doğrulama Testi: ZON'nun kantitatif tayini HPTLC plaka kullanılarak florodansitometrede 254 nm dalga boyunda, Hg lambada, floresans ölçüm modunda,

K320 optik filtrede gerçekleştirildi. Doğrulama testi için AlCl₃ çözeltisi plaka üzerine püskürtülerek 130°C'de 5 dk tutuldu. 254 nm dalga boyu ışık altında yeşil-mavi floresans renk verenler ve 366 nm dalga boyunda mavi floresans renk verenler müspet kabul edildi²⁹.

Silaj Materyali

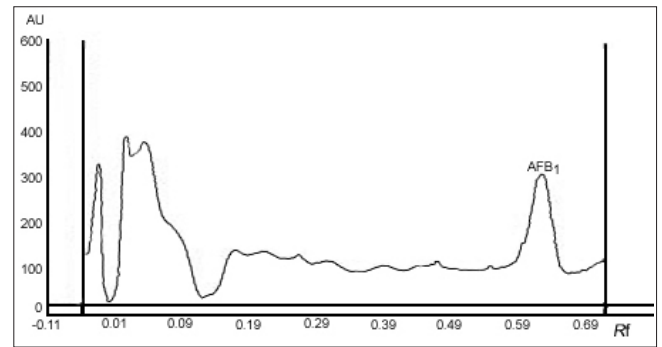
Çalışmada kullanılan mısır silajı örnekleri İç Anadolu Bölgesi'nin tüm illerinden (Aksaray, Ankara, Çankırı, Eskişehir, Karaman, Kayseri, Kırıkkale, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Niğde, Sivas, Yozgat) Eylül 2007 tarihinden sonra hazırlanmış silolardan 1 Mart - 31 Mayıs 2008 tarihleri arasında toplandı. Bu illerin her birinden AFB₁ ve ZON analizleri ile kuru madde tayini ve pH ölçümleri için 20 farklı silodan yaklaşık 1 kg'lık silaj örneği alındı. Böylece 13 ilden toplam 260 örnek alındı. Siloların hayvan tüketimine sunulan kesit yüzeylerinin üst, orta ve alt bölümlerinin her birinin 10'ar farklı noktasından mısır silajı örnekleri alınarak homojenize edildi. +4°C'de taşınarak polietilen torbalarda vakumlandı ve analize kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı³¹.

BULGULAR

Metot Validasyonu

Özgünlük: AFB₁ ve ZON içermeyen silaj örneklerinin HPTLC plakalarda fluorodansitometrik ölçümleri sonrasında dansitogram üzerinde AFB₁ ve ZON'un plaka üzerinde yürüme mesafelerinde (R_f) silaj kaynaklı pikler (*Şekil 1* ve *Şekil 2*) gözlenmedi.

Doğrusallık (Ölçüm Aralığı): AFB₁'in ve ZON'un standart solüsyonlarının 9 farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrileri ve

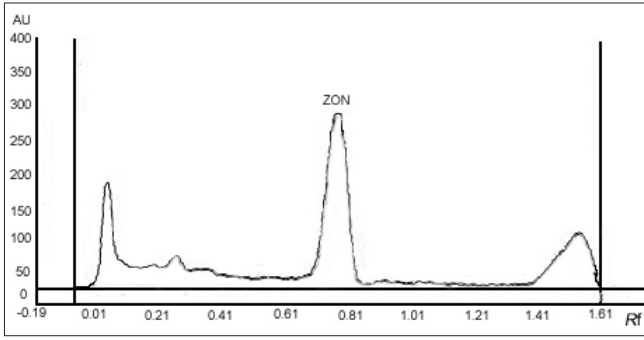


Şekil 1. AFB₁'in dansitogramı: AFB₁'li silaj örneği

Fig 1. AFB₁ densitogram: AFB₁ silage sample

hesaplanan korelasyon katsayılarına (AFB₁ için r²=0.9961, ZON için r²=0.9935) dayanılarak metotların AFB₁ için 5-200 ng ve ZON için 25-1000 ng aralıklarında doğrusal olduğu belirlendi.

Geri Kazanım: AFB₁ ve ZON'u içermeyen silaj örneklerine



Şekil 2. ZON'un dansitogramı: ZON'lu silaj örneği

Fig 2. ZON densitogram : ZON silage sample

final konsantrasyonları AFB₁ için 10, 20, 30 ng/g, ZON için 50, 100, 200 ng/g olan standart çalışma solüsyonlarından yükleme yapıldı. Hesaplanan ortalama geri kazanım değerleri AFB₁ için %73.82; ZON için %80.94 olarak belirlendi.

Duyarlılık: Gün içi tekrar edilebilirlik çalışmasının en küçük değerinin standart sapmasının 3 katı tespit sınırı (Lod) AFB₁ için 2 ppb ve ZON için 12 ppb, standart sapmasının 10 katı ölçülebilirlik sınırı (Loq) ise AFB₁ için 8 ppb, ZON için 40 ppb olarak hesaplandı.

Kesinlik: AFB₁ ve ZON için zenginleştirilmiş silaj örneklerindeki pik alanlara göre belirlenmiş konsantrasyonlar üzerinden hesaplanan varyasyon katsayısı %15'in altında bulundu.

AFB₁ ve ZON Analiz Sonuçları

HPTLC'de fluorodansitometrik ölçümler sonucunda 260 silaj örneğinde yapılan AFB₁ ve ZON analizlerinde örneklerin hiçbirinde AFB₁ ve ZON'a rastlanmamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda İç Anadolu Bölgesi'nde silaj üretiminin ve hayvan beslemede kullanımının yaygınlaşması, buna karşın silaj yapımında kurallara yeterince uyulmaması, yemlerde ve sütte AFB₁ ve ZON bulunabilme ihtimalini artırmıştır. Özellikle sütçü ineklerde görülen jinekolojik problemler de böyle bir araştırmanın gerekliliğini göstermektedir.

Mısır silajında AFB₁ ve ZON'u belirlemek için ağırlığı 5-50 gr aralığında değişen örneklerde farklı ekstraksiyon ve temizleme yöntemleri denendi. AFB₁ için ekstraksiyonda kloroform + su (10+1), metanol + su (6+4), asetonitril + su (8+2) çözeltileri denendi. Temizleme kolonu olarak sep-pak kolon, immunoaffinite kolon, Na₂SO₄-silika jel kolon, eluat çözeltisi olarak kloroform + metanol (97+3), metanol denendi. ZON için ekstraksiyonda kloroform + su (10+1), asetonitril + su (75+25) çözeltileri denendi, temizleme kolonu olarak sep-pak kolon, immunoaffinite kolon, Na₂SO₄-silika jel kolon, eluat çözeltisi olarak tolüen + aseton (9+5), asetonitril + su (1+1), aseton + benzen (5+95) çözeltileri

kullanıldı. Kolon kromatografisinde kullanılan sep-pak, Na₂SO₄-silika jel ve immunoaffinite kolonların silaj materyalinde geri kazanımları yeterli bulunmadı. Çalışmada AFB₁ ve ZON tayininde kullanılan silika jel ve florosil kolonların geri kazanımları sep-pak, Na₂SO₄-silika jel ve immunoaffinite kolonlara göre daha yüksek olduğu için bu kolonlar kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılan HPTLC-fluorodansitometrik analiz yöntemi Avrupa Birliği tarafından tavsiye edilen konfirmasyon yöntemleri arasında yer almaktadır²⁵. Ayrıca ekstraksiyonda kullanılan yöntemler^{27,30} AFB₁ ve ZON tayininde kullanılan diğer yöntemlere³¹⁻³³ göre hızlı, basit, pratik ve ekonomik olduğu için tercih edildi. AFB₁ için kullanılan Kamimura ve ark.'nın²⁷ yöntemi tahıl ürünlerinde %90 üzerinde geri kazanım ve 0.2 ppb LOD elde etmiştir. Yöntemin silajda daha düşük geri kazanım ve LOD değeri elde etmesinin sebebi silajda bulunan pigmentleri, karbohidratlar ve silaj pH'sından kaynaklanabilir³⁴. Lepom'un³⁰ ZON için yaptığı analizlerde elde ettiği geri kazanım ve LOD değerleri ile yöntemin validasyonu sonucunda elde edilen değerler benzerdir.

Literatür incelemelerine göre yapılan bu çalışma, Türkiye'de mısır silajlarında AFB₁ ve ZON'un HPTLC-fluorodansitometrik ölçüm ile belirlenmesine dair yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışmada, İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan toplam 13 ilden 260 adet hayvancılık işletmesinden alınan mısır silajlarının AFB₁ ve ZON kirlilikleri araştırıldı. Çalışma sonunda İç Anadolu Bölgesi illerinden toplanan 260 mısır silajı örneğinin hiç birinde AFB₁ ve ZON'a rastlanmadı. İncelenen örneklerin hiç birinde AFB₁ ve ZON tespit edilememesi örnek alınan 260 silonun her iki toksin yönünden güvenli olduğunu ve bölgedeki silajların bu toksinler yönünden güvenli olabileceğini gösteren ümit verici bir durumu ifade etmektedir.

Dünyada silajlarda AFB₁ ve ZON kirliliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan araştırmaların sayısı giderek artmaktadır. Türkiye'de silajlarda yapılan toksikolojik çalışmalar ve AFB₁ ve ZON araştırmaları yeterli düzeyde değildir. Buna karşın yem ve diğer yem hammaddelerinde AFB₁ ve ZON araştırmaları Türkiye'de AFB₁ ve ZON kirliliğine dair önemli veriler sunmaktadır. Araştırmacılar Karakaya ve Atasever³³ Erzurum ili Pasinler ilçe merkezi ve köylerindeki 72 adet süt işletmesinden aldığı silaj örneklerini ELISA ile AFB₁ yönünden incelemiş ve sonuçta silaj örneklerinin 69 (%95.83)'ünde oldukça düşük düzeyde (ortalama 0.36 ppb) AFB₁ tespit etmişlerdir.

Garon ve ark.'nın³² Fransa'nın Normandiya bölgesinden 2004 Eylül- 2005 Mayıs aylarında aylık olarak temin ettikleri mısır silajı örneklerinde AFB₁ için tespit limiti 1.5 ppb ve ZON için tespit limiti 6.5 ppb olan HPLC-MS yöntemi ile çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada muhtemelen tarladan veya silo yapımı esnasında silaja bulaşan AFB₁ fermantasyon başlangıcında 30 ppb düzeyinde tespit edilmiştir. Bu düzey sonraki günlerde azalmış ve 10 ppb'de sabit kaldığı

tespit edilmiştir. ZON ise silolama dönemi başlangıcında 30 ppb düzeyinde iken silajın son döneminde aynı düzeyde bulunmuştur. Son çalışmalarda gerek tarlada bulaşmış gerekse silajda üremiş olan AFB₁ ve ZON düzeyinin asidik silaj ortamında azaldığı iddia edilmektedirler.

Driehuis ve ark.³¹ Hollanda'da 2002-2004 yılları arasında LC-MS/MS cihazında AFB₁ ve ZON kirliliklerinin tespiti için 140 mısır silajı, 120 ot silajı ve 30 buğday silajı örneği kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada mısır silaj örneklerinin %49'unda, ot silajlarının %6'sında ortalama düzeyleri 174 ppb olan ZON tespit edilmiş, buna karşın buğday silajında ZON tespit edilememiştir. AFB₁ hiç bir silaj örneğinde belirlenmemiştir.

Richard ve ark.¹⁹ Fransa'da 11 aylık 205 mısır silajı örneğinde AFB₁ için tespit limiti 1.5 ppb ve ZON için tespit limiti 20 ppb olan HPLC-MS yöntemi ile yaptıkları çalışmada örneklerin hiçbirinde AFB₁ ve ZON tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Bu araştırma sonuçları mevcut araştırma ile uyumlu görülmektedir.

Bazı araştırmacılar mikotoksin üremesi ve düzeyi ile ilgili deneysel çalışmalar yapmışlardır. Örneğin Damoglou ve ark.'nın³⁵ yaptıkları çalışmada ot silajına *Fusarium roseum* ve *Fusarium tricinctum* mantarları ile 500 ppb ZON ve T-2 toksin ilave etmişlerdir. Mantar sayımı ve mikotoksin düzeylerini belirli aralıklarla tespit etmişlerdir. ZON'un 0. ve 96. saatler arasında yapılan 5 analizde ZON düzeylerinin düştüğü ve 96. saatte ZON'un tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak silajda fermantasyon sürecinde mikrobiyel aktivite sebebiyle ZON'un parçalandığını iddia etmişlerdir.

Laktik asit bakterileri (LAB)'nin mikotoksinlerin oluşmasının engellenmesinde önemli biyolojik bir inhibitör olduğu kaydedilmektedir³⁶. Khanafari ve ark.'nın⁹ gerçekleştirdiği AFB₁'in *Lactobacillus plantarum* ile biyolojik kontrolünü amaçlayan bir çalışmada, AFB₁ ile bulaştırılmış mısıra ilave edilen *Lactobacillus plantarum*'un AFB₁ düzeyini azalttığı bildirilmiştir. LAB'ın AFB₁ oluşmasını engellediği dikkate alındığında söz konusu çalışmada elde edilen bulgular ile yapılan bu çalışmanın bulgularının uyum sağladığı söylenebilir. Yapılan bu çalışmada incelenen örneklerde AFB₁ ve ZON tespit edilememesi ya iyi silaj şartlarında mikotoksin oluşmadığını ya da oluşan toksinlerin asidik silaj ortamında tespit edilemeyecek düzeylere indiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada İç Anadolu Bölgesi illerinden toplanan mısır silajlarında yapılan analizlerde silaj örneklerinin hiç birinde AFB₁ ve ZON kirliliği tespit edilmemiştir. Bu çalışmada kullanılan developman çözeltisi (Kloroform + Aseton + Bidistile su) ile daha yüksek R_f değeri elde edilerek AF'in kirliliklerden daha iyi arındırılması sağlanmıştır. ZON analizinde de TLC yerine HPTLC kullanılarak daha az miktardaki developman çözeltisi ile analizlerin gerçekleştirilmesi mümkün olmuştur. AFB₁ ve ZON analiz-

lerinde yapılan modifikasyonlar ile mevcut yöntemler laboratuvar rutin olarak kullanılabilir hale getirilmiştir.

Yapılan analizlerde tespit limitleri üzerinde AFB₁ ve ZON kirlilikleri bulunmamasına rağmen diğer mikotoksinlerin bulunabileceği düşünülerek silajın üretim, depolama ve yedirme esnasında şartlar uygun olduğu takdirde mantar bulaşması, dolayısıyla mikotoksin üremesi olabileceği her zaman göz önünde tutulmalıdır. Bu nedenle silajın üretimden tüketimine kadar tüm işlemler mantar gelişimini en aza indirecek şekilde yapılmalı ve özellikle silolama prensiplerine uyularak silajda sürekli bir anaerob ortam sağlanmalıdır.

LAB'nin fermantasyon döneminde ürettiği laktik asitin AF üretimini engellediği düşünüldüğünden silaj yapımı sırasında LAB'ni içeren mikrobiyal inokulantların silaj katkısı olarak katılması tavsiye edilebilir.

KAYNAKLAR

- Diaz D:** Mycotoxin contamination in silages. *WDN*, 6, 175-176, 2006.
- Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, Macdonald S, Crews C:** Mycotoxin analysis: An update. *Food Addit Contam*, 25, 152-163, 2008.
- Scudamore KA, Livesey T:** Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review. *J Sci Food Agric*, 77, 1-17, 1998.
- O'brien M, Nielsen KF, O'kiely P, Forristal PD, Fuller HT, Frisvad JC:** Mycotoxins and other secondary metabolites produced *in vitro* by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem*, 54, 9268-9276, 2006.
- Oguz H, Nizamlioglu F, Dinc I, Uney K, Aydın H:** Karma yem, un ve bulgur örneklerinde aflatoksin kalıntılarının araştırılması. *Eurasian J Vet Sci*, 27 (3): 171-175, 2011.
- Salwa MH, Hegazi SM, Demet O, Oguz H:** Comparative study on the influence of aflatoxin and ochratoxin performance of broiler chicks. *J Egypt Vet Med Ass*, 60, 201-212, 2000.
- Oguz H:** A review from experimental trials on detoxification of aflatoxin in poultry feed. *Eurasian J Vet Sci*, 27 (1): 1-12, 2011.
- Oguz H, Kurtoglu V:** Effect of clinoptilolite on fattening performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *Br Poult Sci*, 41, 512-517, 2000.
- Khanafari A, Soudi H, Miraboufathi M:** Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ production in corn. *Iran J Environ Health Sci Eng*, 4, 163-168, 2007.
- Oguz H:** Broiler yemine katılan polivinilpolipirodolan (PVPP)'un ve diğer adsorbonlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkinliklerinin belirlenmesi. *Doktora Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 1997.
- Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z:** Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1143, 48-64, 2007.
- Ostry V, Skarkova J:** An HPTLC method for the determination of mycotoxin zearalenone in cereal products. *Mycotoxin Res*, 19, 64-68, 2003.
- Richard JL, Bennett GA, Ross PF, Nelson PE:** Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. *J Anim Sci*, 71, 2563-2574, 1993.
- Minervini F, Dell'Aquila MA:** Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mo Sci*, 9, 2570-2584, 2008.
- Lepom P, Baath H, Knabe O:** Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in maize. 3. The influence of silaging on the zearalenone

content of corn maize. *Arch Anim Nutr*, 38, 817-823, 1988.

16. Hadiani MR, Yazdanpanah H, Ghazi-Khansari M, Cheraghali AM, Goodarzi M: Survey of the natural occurrence of zearalenone in maize from northern Iran by thin-layer chromatography densitometry. *Food Addit Contam*, 20, 380-385, 2003.

17. Lepom P, Baath H, Knabe O: Occurrence of Fusarium species and their mycotoxins in maize. 6. Formation of zearalenone and trichothecenes type a by indigenous Fusarium isolates. *Arch Anim Nutr*, 40, 871-883, 1990.

18. Ranjan KS, Sinha AK: Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, India. *J Sci Food Agric*, 56, 39-47, 1991.

19. Richard E, Heutte N, Sage L, Pottier D, Bouchart V, Lebailly P, Garon D: Toxicogenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem Toxicol*, 45, 2420-2425, 2007.

20. Campbell HM, Armstrong JF: Determination of zearalenone in cereal grains, animal feed and feed ingredients using immunoaffinity column chromatography and liquid chromatography: Interlaboratory study. *J AOAC Int*, 90, 1610-1622, 2007.

21. Kaya S: Mikotoksinler ve mikotoksin zehirlenmeleri. In, Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (Eds): Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. 1. Baskı, s. 341-375, Medisan Yayınları, Ankara, 1998.

22. Kalkan H, Filya İ: Mikotoksinler ve çiftlik hayvanları üzerindeki etkileri. *GAP 4. Tarım Kongresi*, 2. Cilt, s. 1710-1715, Şanlıurfa, 21-23 Eylül 2005.

23. 27653 Sayılı Resmi Gazete: Yemlerde istenmeyen maddeler hakkında tebliğde değişiklik yapılmasına dair tebliğ (No:2010/33), 26.07.2010, <http://www.resmigazete.gov.tr>, Erişim Tarihi: 29.06.2011.

24. 27714 Sayılı Resmi Gazete: Yemlerde istenmeyen maddeler hakkında tebliğde değişiklik yapılmasına dair tebliğ (No:2010/46), 29.09.2010, <http://www.resmigazete.gov.tr>, Erişim Tarihi: 29.06.2011.

25. 2002/657/EC: Commission Decision 12 August (2002) implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical

methods and the interpretation of results. *Official Journal L221*, 8-36, 17/08/2002.

26. Eurochem Guide: The Fitness for purposes of analytical methods. Available from www.eurachem.org/guides/html/mual.htm, Erişim tarihi: 28.07.2010.

27. Kamimura H, Nishijima M, Yasuda K, Ushiyama H, Tabata S, Matsumoto S, Nishima T: Simple rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. *J Assoc Off Anal Chem*, 65, 458-461, 1985.

28. Scott PM: Mycotoxin methodology. *Food Addit Contam*, 12, 395-403, 1995.

29. Trucksess MW: Natural Toxins. *J AOAC Int*, 49, 1-64, 2000.

30. Lepom P: Vorkommen von fusarium-arten und ihren mykotoxinen auf silomais. *Arch Anim Nutr*, 9, 799-806, 1988.

31. Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, Te Giffel MC: Occurrence of mycotoxins in maize, grass, and wheat silage for dairy cattle in Netherlands. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 1, 41-50, 2008.

32. Garon D, Richard E, Sage L, Bouchard V, Pottier D, Lebailly P: Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. *J Agric Food Chem*, 54, 3479-3484, 2006.

33. Karakaya Y, Atasever M: Mısır silajında aflatoksin B₁ varlığının ve süte geçme durumunun araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 123-127, 2010.

34. Stolker AAM, Brinkman UAT: Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - A review. *J Chromatogr A*, 1067, 15-53, 2005.

35. Damoglou AP, Shannon W, Downey GA: The interaction between fusaria and their mycotoxins in grass silage. *J Sci Food Agric*, 35, 279-284, 1984.

36. Munimbazi C, Bullerman LB: Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. *Mycopathologia*, 140, 163-169, 1997.