

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**PASTÖRİZE GÜNLÜK SÜT VE UHT SÜT  
ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN M1 VARLIĞI VE  
DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

**CANAN ALATALI**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. MELTEM UZUN**


**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**


**İSTANBUL-2017**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans öğrencisi **Canan Alatalı** tarafından Prof Dr Meltem Uzun'un danışmanlığında hazırlanan "**Pastörize Günlük Süt ve UHT Süt Örneklerinde Aflatoksin M1 Varlığı ve Düzeyinin Araştırılması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 05 /05/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

  
**Jüri Başkanı**  
Prof Dr Ali Ağaçfıdan  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

  
**Jüri**  
Prof Dr Mine Küçüker  
Yeni Yüzyıl Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

  
**Jüri (Danışman)**  
Prof Dr Meltem Uzu  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Canan ALATALI



## İTHAF

Kıymetli dostum Bil.Uzm.Seda Kılıç'a ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez konusunu seçerken yardımcı olan, araştırmalarımın yürütülmesinde ve her konuda yol gösteren, sevgi ve desteğini hiç esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerini içtenlikle paylaşan, saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Meltem UZUN'a, üzerimdeki tüm hakları ve emekleri için çok teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübeleriyle, yüksek lisans eğitimim sırasında büyük emeği geçen, başta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Selim BADUR, Prof. Dr. Bülent GÜRLER, Prof. Dr. Şengül DERBENTLİ, Prof. Dr. Nezahat GÜRLER, Prof. Dr. Yıldız YEĞENOĞLU, Prof. Dr. O. Şadi YENEN, Prof. Dr. Betigül ÖNGEN, Prof. Dr. M. Derya AYDIN, Prof. Dr. Zayre ERTURAN, Prof. Dr. Özden BÜYÜKBABA BORAL, Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ, Doç. Dr. Dilek ŞATANA, Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim ve tez dönemim boyunca yardımlarını esirgemen, sorularımı ve sorunlarımı içtenlikle dinleyip çözüm yolu arayan Dr. Gonca ERKÖSE GENÇ'e, hayatımın her evresinde bana destek olan Bil. Uzm. Ilgın KAYA'ya,

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Laborant Zeynep DEMİR, Laborant Sercan ASLAN ve Laborant Mukaddes ÜNSAL'a,

Başta, Bil. Uzm. Esra YILDIRIM ve Dr. Deniz SERTEL olmak üzere birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, gösterdikleri ilgi ve dostlukları için minnettar olduğum tüm yüksek lisans, doktora ve uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma ve sevgili Muazzez UYAR'a,

Kıymetli dostlarım Esra KIRIKKAYA, Melda DEMİR ve Bil. Uzm. Sena ÖNER'e

Hayatım boyunca karşılıksız maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan, üzerimdeki emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim ve her zaman minnettar olduğum sevgili annem, babam ve ablama göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:[57960](#)

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER .....	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİ
ÖZET .....	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Mikotoksinlerin Tarihçesi .....	4
2.2. Mikotoksin Oluşumuna Etki Eden Faktörler .....	5
2.2.1. Fiziksel Faktörler .....	5
2.2.1.1. Rutubet (Nem).....	5
2.2.1.2. Sıcaklık.....	6
2.2.1.3. Oksijen ve Karbondioksit Miktarı.....	6
2.2.1.4. Zaman.....	7
2.2.1.5. Mekanik Hasarlar .....	7
2.2.1.6. pH.....	7
2.2.1.7. Diğer Faktörler .....	7
2.2.2. Kimyasal Faktörler.....	7
2.2.3. Biyolojik Faktörler .....	8
2.3. Başlıca Mikotoksinler .....	8
2.3.1. Aflatoksinler.....	10
2.3.2. Okratoksinler.....	12
2.3.3. Patulin .....	13
2.3.4. Zeranol .....	13
2.4. Mikotoksinlerin Tanı Yöntemleri .....	14

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Süt Örneklerinin Toplanması.....	17
3.2. Kit İçeriği.....	17
3.3. Analizlerde Kullanılan Cihazlar, Araç ve Gereçler.....	17
3.4. Sütlerin Analize Hazırlanması.....	18
3.5. Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması.....	18
3.6. Testin Uygulanması.....	18
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA.....	25
KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	37

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-2-1: Başlıca mikotoksin türleri, mitotoksin oluştran mantarlar, kaynakları ve hedef organ ve dokularda oluşturdukları etkileri.....	9
Tablo 2-2: AFM1 için süt ve süt ürünlerindeki uluslararası sınırlar.....	12
Tablo 4-1: Farklı lot numaralı UHT süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeyleri (ng/L) .....	20
Tablo 4-2: UHT süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı .....	21
Tablo 4-3: UHT süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı .....	21
Tablo 4-4: Farklı lot numaralı pastörize günlük süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeyleri (ng/L) .....	22
Tablo 4-5: Pastörize günlük süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı.....	23
Tablo 4-6: Pastörize günlük süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı.....	23

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları.....	11
Şekil 2-2: OTA'nın kimyasal yapısı .....	13
Şekil 2-3: Patulinin kimyasal yapısı .....	13
Şekil 2-4: ZEN'in kimyasal yapısı.....	14
Şekil 3-1: Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121) test kiti.....	17
Şekil 3-2: Kullanılan süt örneklerinin hazırlanması .....	18
Şekil 4-1: Standart eğrisi.....	24



**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AF: Aflatoksin

AFB1: Aflatoksin B1

AFB2: Aflatoksin B2

AFM1: Aflatoksin M1

AFM2: Aflatoksin M2

AFG1: Aflatoksin G 1

AFG2: Aflatoksin G 2

CPA: Siklopiazonik asit

°C: Santigrat derece

DNA: Deoksiribonükleik asit

DON: Deoksinivalenol

ELISA: Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant Yöntemi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

EMIT : Enzim Aktivitesine Bağlı İmmunoteknik Yöntem (Enzyme Multiplied Immunotechnique)

FB: Fumonisin

GC: Gaz kromatografisi (Gas Chromatography)

GLC: Gaz-sıvı kromatografisi (Gas-Liquid Chromatography)

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High-Performance Liquid Chromatography)

ARC: Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (International Agency of Research on Cancer)

kg: Kilogram

L: Litre

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

mL: Mililitre

ng: Nanogram

OTA: Okratoksin A

PE: Polietilen

RNA: Ribonükleik asit

TAF: Toplam aflatoksin

UHT: Ultra yüksek sıcaklık (Ultra-High Temperature)

UV: Ultraviyole

ZEN: Zeranol



## ÖZET

Alatalı C. Pastörize Günlük Süt ve UHT Süt Örneklerinde Aflatoksin M1 Varlığı ve Düzeyinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2017.

Aflatoksinler, tahıl, tohum, baharat, et, süt ve süt ürünlerini içeren pek çok gıda ile hayvan yemlerinde yaygın olarak bulunabilen mikotoksinler olup, genellikle *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus*'un belirli suşları tarafından üretilen sekonder toksik metabolitlerdir. AFM1, AFB1' in hidrosillenmiş ara ürünüdür. AFB1 ile kontamine yemleri tüketen hayvanlarda AFB1 metabolize edilerek, AFM1'e dönüşür. AFM1, pastörizasyon ve sterilizasyona dayanıklıdır, bu nedenle AFM1 bulunan sütlerden yapılan tüm ürünler toksin içerir. Hemen hemen her yaşta tüketilen süt ve süt ürünlerinden AFM1 ile kontamine olmuş ürünleri tüketmek zaman içerisinde insan sağlığını tehdit edecek sonuçlar doğurmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada Türkiye'deki yasal toksin düzeyi (50 ng/L) temel alınarak 75 UHT ve 75 pastörize günlük sütteki aflatoksin düzeyleri belirlenmiştir. Çalışılan 75 UHT süt örneğinin 69' unda (%92) farklı düzeylerde AFM1 varlığı saptanırken, bu süt örneklerinin 3'ünde (%4) yasal sınırın aşıldığı (sırasıyla 88,2 ng/L, 55,0 ng/L ve 54,4 ng/L) belirlenmiş ve 6 (%8) örnekte toksine rastlanmamıştır. Çalışılan 75 pastörize günlük süt örneğinin tümünde farklı düzeylerde toksine rastlanırken, hiç bir örnekte toksin düzeyi yasal sınırı aşmamıştır. Tüm örnekler değerlendirildiğinde, 150 süt örneğinin 144'ünün (%96) çeşitli düzeylerde AFM1 ile kontamine olduğu, 3'ünün (%2) yasal sınırın üzerinde toksin içerdiği ve 6'sının (%4) toksin içermediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada UHT süt örneklerinin sadece 3'ünde (%4) yasal sınırın aşılması nedeniyle, sütlerde belirlenen AFM1 düzeylerinin ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmadığı sonucuna varılmış ancak, bu durumu devam ettirmek için hayvan yemlerindeki AFB1 düzeylerinin ve depo koşullarının düzenli olarak kontrol edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Aflatoksin, AFM1, Mikotoksin, Süt, *Aspergillus*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:[57960](#)

## ABSTRACT

Alatalı Canan. Investigation of Aflatoxin M1 Presence and Levels in Pasteurized Daily Milk and UHT Milk Samples. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology, İstanbul, 2017.

Aflatoxins which are mycotoxins commonly found in many foods and animal feeds, including cereals, seeds, spices, meat, milk and dairy products, are often secondary toxic metabolites produced by certain strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. AFM1 is the hydroxylated intermediate product of AFB1. In animals consuming contaminated feeds with AFB1, it metabolizes and converts to AFM1. AFM1 is resistant to pasteurization and sterilization, so all products made from AFM1 contaminated milk contain toxins. Because milk and dairy products are important for health in almost all ages, consuming products contaminated with AFM1 result in threats to human health over time. For this reason, presence and levels of AFM1 in 75 pasteurized daily milk and 75 UHT milk samples were investigated based on legal limit in Turkey (50 ng/L). Different levels of AFM1 were detected in 69 of 75 (92%) UHT milk samples while the legal limit was exceeded (88.2 ng/L, 55.0 ng/L and 54.4 ng/L, respectively) in 3 (4%) and no toxin was shown in 6 (8%) samples. Various toxin levels were detected in 75 pasteurized daily milks, but the legal limit was not exceeded in any of the sample. When all samples were evaluated, it was determined that 144 of 150 milk samples (96%) were contaminated with AFM1 at various levels, 3 (2%) had toxin over the legal limit and no toxin was found in 6 (4%) samples. In conclusion, this study showed that AFM1 levels in milk samples did not constitute a serious public health problem because only 3 (4%) of the UHT milk samples had exceeded the legal limit, but it was thought that, the AFB1 levels in animal feeds and the storage conditions should be controlled regularly for continuing this conditions.

Keywords: Aflatoxin, AFM1, Mycotoxins, Milk, *Aspergillus*

The present study was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: [57960](#)

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* gibi mantar cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı açısından güçlü ve çeşitli toksik etkiler oluştururlar (1). Mikotoksinleri üreten mantarlar atmosferde hava akımları ve rüzgarlar ile taşınarak atmosferin çeşitli katmanlarında bulunabilirler. Mikotoksinlerin kontaminasyon dereceleri ürünün cinsine, iklim koşullarına ve coğrafi konuma göre mevsimsel olarak ve yıldan yıla farklılık gösterebilir. Dünya genelinde ürünlerin dörtte birinin mikotoksin ile kontaminasyon riskinin olduğu bildirilmiştir (1,2).

Aflatoksinler, tahıl, tohum, baharat, et, süt ve süt ürünlerini içeren pek çok gıda ile hayvan yemlerinde yaygın olarak bulunabilen mikotoksinler olup genellikle *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus*'un belirli suşları tarafından üretilirler (3,4). Günümüzde aflatoksinler, B1, B2, G1, G2, M1, M2 olmak üzere başlıca altı ana bileşikten oluşmaktadır. Ultraviyole ışık altında mavi floresans verenler aflatoksin B1 (AFB1) ve AFB2, yeşil floresans verenler ise AFG1 ve AFG2 olarak adlandırılmaktadır. Bunlara ek olarak, gerek hayvan vücudundan gerekse küf üreyen kültürlerden elde edilen metabolitler ile birlikte sayıları on yediyi bulmaktadır (3,5,6).

Aflatoksin M1 (AFM1), aflatoksin B1 (AFB1) bulaşmış yemleri tüketen hayvanların sütlerinde bulunan hepatokarsinojenik etkiye sahip bir metabolittir. Aflatoksinlerin karsinojenik potansiyelleri AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 şeklinde azalmaktadır (7). AFM1, AFB1'in hidrosillenmiş ara ürünüdür. *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* hasat öncesi ve sonrası dönemde AFB1 oluşturarak hayvan yemlerinde kontaminasyona neden olurlar. AFB1 ile kontamine yemleri tüketen hayvanlarda AFB1 metabolize edilerek, AFM1'e dönüşür. Besin ile alınan aflatoksin B1'in yaklaşık %0,3- % 6,2 'si sütlerde AFM1 olarak bulunur. AFM1, pastörizasyon ve sterilizasyona dayanıklıdır, bu nedenle AFM1 bulunan sütlerden yapılan tüm ürünler toksin içerir. İnsanlara bulaşta yem kontaminasyonu birinci yol olmakla beraber, süt ve süt ürünlerinin bu küflerle sonradan kontaminasyonu sonucunda da insanlara aflatoksin bulaşı olmaktadır (6).

İnsanlar tarafından en çok tüketilen kümes, küçük ve büyükbaş hayvanların et, süt, yumurta gibi ürünlerinden çok az miktarda alınan AFB1'in bile başta karaciğer olmak üzere dokulara geçebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu toksinlerin

DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonu, çeşitli enzim aktivitelerinde azalma, glukoz metabolizması depresyonu, lipid sentezi inhibisyonu ve pıhtılaşma faktörü inhibisyonu gibi metabolik etkileri vardır (6,8,9,10). Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (International Agency of Research on Cancer (IARC)) tarafından AFB1 Grup 1 karsinojen, AFM1 ise Grup 2 karsinojen olarak bildirilmiştir (7). Kanser türleri arasında hepatosellüler karsinom görülme sıklığı bakımından 5. sırada, mortalite bakımından 3. sırada yer almaktadır. AFB1, karaciğer kanserine sebep olan Hepatit C virüsü ile de sinerjik etki yaratmaktadır. Primer karaciğer kanserinin çok orijinli olduğuna inanılsa da, aflatoksin B1 yiyecek kontaminantı olarak yaygın bulunması nedeniyle en güçlü faktördür (11). Kontamine süttten yapılan peynirlerde, peynirin daha konsantre bir ürün olması nedeniyle, yapıldığı süttten 3-3,5 kat daha fazla aflatoksin taşıdığı saptanmıştır. Diğer birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de pek çok gıda maddesi için aflatoksin B1 (AFB1), toplam aflatoksin-TAF (B1, B2, G1 ve G2) ve aflatoksin M1 (AFM1) ile ilgili yasal sınırlar belirlenmiştir. Buna göre, süt ve süt ürünleri açısından getirilen yasal kısıtlamalarda, çiğ süt, ısıl işlem görmüş süt ve süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütlerde maksimum AFM1 miktarının 0,05 µg /kg olması gerektiği belirtilmiştir (Türk Gıda Kodeksi - 2008/26 No) (12).

İnsan ve hayvanlarda meydana gelen akut ya da kronik tipteki mikotoksikoz başka hastalıklar ile karıştırılabilir. Mikotoksikozun diğer hastalıklardan ayırt edilebilmesi için uygun yöntemlerle analiz edilmesi gereklidir. Gıda güvenliğinin sağlanması ve gıda kökenli zehirlenmelerin kontrol altına alınması için mikotoksin teşhisi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle değişik analiz yöntemleri geliştirilmiştir (13).

Tanı amacıyla kullanılan yöntemlerden bazıları, İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Kolon Kromatografisi, Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS), Enzim Aktivitesine Bağlı İmmunoteknik (Enzyme Multiplied Immunotechnique/EMIT) ve Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant yöntemi (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) dir. Şimdiye kadar bütün mikotoksin türleri için uygulanabilecek tek bir analiz yöntemi bulunamamıştır. Analiz yöntemleri mikotoksin türüne ve analiz edilecek besinin cinsine göre değişiklikler göstermektedir (14,15,16).

İmmunokimyasal yöntemlerde antijen ve antikor etkileşimlerinden yararlanılır. Mikotoksinlerin belirlenmesinde Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

sıklıkla kullanılan bir immunokimyasal yöntemdir. ELISA yöntemi antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak esasına dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir. Antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aranabilir. Kompetatif ELISA yönteminde, yüzeyi araştırılan toksine karşı spesifik antikorlarla kaplanmış plaklar kullanılmaktadır. Yöntemin çalışma prensibi serbest ve işaretlenmiş antijenlerin antikorlara karşı yarışması temeline dayanmaktadır. Sonuçlar standart gruplarla kıyaslanarak değerlendirilir (13,17).

Besinlerde küflerin üremesini ve aflatoksin oluşumunu engelleyebilmek ve dolayısıyla oluşabilecek ekonomik kayıpların ve hastalıkların önüne geçebilmek için, mantarla kontamine olmamış tohum kullanımı, böcek ve hastalıkların kontrolü, yeterli aşılama, kuraklıktan mümkün olduğunca korunma, ürün olgunken ve çabuk hasat yapma, mekanik hasarı en aza indiren hasat tekniklerinin kullanımı gereklidir. Hasat sonrası aflatoksin kontaminasyonunun kontrol altına alınması ve önlenmesi, hasat edilen ürünün hızlı bir şekilde kurutulması, depolama ve nakliyat işlemlerinin aflatoksin oluşumunu engelleyecek nem seviyelerinde yapılmasına bağlıdır. Ek olarak, hasat edilen ürünlerde depolama esnasında bazı basit uygulamalarla (UV lambası veya vakum uygulaması gibi) hasarlı ve olası toksin içeren ürünlerin teşhisi ve ayırdı sağlanarak ürünün sağlam kısmında kontaminasyon oluşumunun önlenmesi mümkün olmaktadır (2,5,11).

Bu çalışmada, hemen her yaşta, özellikle anne sütü bırakıldıktan sonra bebekler ve küçük çocuklar tarafından sıklıkla tüketilen sütte, halk sağlığı açısından önemini belirttiğimiz AFM1 varlığı ve düzeyi kompetatif ELISA (Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121) yöntemi ile araştırılmış ve bu amaçla İstanbul'daki süpermarketlerden farklı lot numaralarına sahip 75 UHT ve 75 pastörize günlük süt örneği toplanmıştır. Çalışmanın sonucunda mevcut yasal toksin düzeyleri göz önüne alınarak sütlerde potansiyel bir risk olup olmadığı belirlenmiş ve epidemiyolojik verilere katkı sağlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mikotoksinlerin Tarihçesi

Mikotoksinler, belirli küflerin metabolizması sonucu oluşan ve mikotoksin bulaşmış yemleri tüketen hayvanlar ile kontamine besinleri tüketen insanlarda zehirlenmelere ve hatta ölüme yol açabilen toksinlerdir. Mikotoksin terimi Yunanca mantar anlamına gelen “myco” ve zehir anlamındaki “toxin” kelimelerinin birleştirilmesinden oluşmuştur. Mikotoksinlerin sebep oldukları zehirlenme olaylarına mikotoksin zehirlenmesi veya “mikotoksikoz” adı verilmektedir. Mikotoksinlerin insanlar ve hayvanlarda hastalık meydana getirdiğine dair bilgiler çok eski yıllara dayanmaktadır. Bilinen ilk mikotoksin zehirlenmesi ortaçağda çavdar mahmuzu olarak bilinen *Claviceps purpurea*'nın salgıladığı ergot alkaloidinden kaynaklanan ergotizm mikotoksikozudur. Çavdar mahmuzuyla infekte unlardan hazırlanan ekmekleri tüketen insanlarda, yüksek ateşin yanı sıra, ellerde, kollarda, parmaklarda, ayaklarda ve bacaklarda nekroz belirtileri görülmüş ancak hastalığın sebebi belirlenememiştir. *Claviceps purpurea*'nın toksin maddesi olan ergot alkaloidinin hastalık etkeni olduğu ancak 19. yüzyılda anlaşılmıştır. Ortaçağda bu belirtiler ile ergotizm “Kutsal ateş” veya “Aziz Antonius humması (St. Anthony’s fire)” olarak adlandırılmıştır (13,18).

İngiltere’de 1960 yılında ortaya çıkan ve nedeni bilinmeyen bir hastalık yaklaşık 100.000 kadar hindinin ölümüne sebep olmuş ve bilim camiası tarafından şaşkınlıkla karşılanan bu durumun sebebi bilinmediği için “Hindilerin X hastalığı (Turkey’s X Diseases)” olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan araştırmalarda hastalığın, küflenmiş yer fıstığı küspelerinin katıldığı yemlerin hindiler tarafından yenmesiyle meydana geldiği anlaşılmış ve etken olarak *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* gösterilmiştir. Bu olay yaşanana kadar mantarların sadece besinleri kontamine ettiği düşünülmüş ancak 1960 yılından sonra mikotoksikoz olayları için bir dönüm noktası olmuş ve mantar metabolitleri üzerinde yaygın olarak araştırma yapılmaya başlanmıştır (14,18,19,20).

İlk kez 1967 yılında Kanada’ya ihraç edilen fındık içlerinin yaklaşık 10 ton kadarının geri dönmesiyle Türkiye’de aflatoksin sorunuyla tanışmıştır. 1972 ve 1974 yıllarında Amerika Birleşik Devletleri’ne ihraç edilen Antep fıstıkları geri dönmüş, 1973 ve 1974 yıllarında ise kuru incir ihracatında hem ABD hem de Danimarka ile

sorunlar yaşanmıştır. Yaşanan bu olumsuz durumlar mikotoksikozun sağlık açısından zararlarının yanı sıra ekonomik açıdan da öneme sahip olduğunu göstermiştir (13).

## **2.2. Mikotoksin Oluşumuna Etki Eden Faktörler**

Tarım ürünlerinin tarladan tüketime kadar olan aşamalarında, ekolojik koşullara göre oluşan mikotoksinler bazı mantarların sekonder metabolitleridir. *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium* gibi bazı küfler tarafından uygun nem ve sıcaklık koşullarında oluşturulurlar. En sık karşılaşılan mikotoksinler, aflatoksin, okratoksin, trikotesenler, zeranol, patulin, siklopiazonik asit ve fumonisinlerdir (17,20). Mikotoksin üreten mantarlar, bitkiyi hasat öncesi dönemde veya hasat sonrasında infekte edebilirler. Pek çok cins mantar büyüme, gelişme ve özellikle mikotoksin üretimi için belirli koşullara ihtiyaç duyar. Bu koşullar, nem, sıcaklık, besinsel faktörler, oksijen ve karbon dioksit düzeyleri, diğer mantar türlerinin varlığı, coğrafi konum, genetik şartlar olarak sıralanabilir (21). Mantarlar üremek için temel ve makro elementlere ihtiyaç duyarlar (karbon, azot, potasyum, fosfor vb.). Bazı mantar türleri bitkiler üzerinde fitoparazit olarak yaşarlar. Bir kısım mantar türleri ise ürünlerin işlenmesi ve depolanması sırasında bulaş yoluyla kirletici olarak rol oynarlar. Her mantar üremesi ve küf oluşumu, toksin üretimi anlamına gelmemektedir. Bazı hayvansal ürünlerde (salam, sosis gibi işlenmiş ürünlerde) mantar ürediği halde toksin üretilmediği bildirilmiştir (22).

Küflerin üremelerini ve mikotoksin sentezlemelerini etkileyen başlıca faktörler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç bölümde incelenir.

### **2.2.1. Fiziksel Faktörler**

Birçok gıda maddesi üretim esnasında, tarlada, hasatta veya depolamada mantarlarla kontamine olabilir. Mantar ile kontamine olmuş ürünlerde toksin üretimi çeşitli fiziksel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir.

#### **2.2.1.1. Rutubet (Nem)**

Gıda ve besin maddelerinde küflerin gelişmesinde ortamın ve besin maddesinin rutubetinin büyük etkisi vardır. Ortamın bağıl nem oranı arttıkça küflerin üremeleri ve toksin oluşturmaları kolaylaşır. Küflerin üremesi ve toksin sentezleyebilmesi için gereken nem oranları birbirinden farklıdır ve üreyebilmek için gereken nem oranı, toksin salgılayabilmek için gereken nem oranından daha düşüktür. Küfler, genel olarak

ortam rutubetinin % 50-60'ın üzerine çıktığı, gıda rutubetinin ise % 9'un üzerine çıktığı şartlar altında kolayca üreyebilirler ve mikotoksin sentezleyebilirler (7).

Araştırma sonuçlarına göre, mantarların toksin oluşturmasının önüne geçebilmek için tarım ürünleri hızlı bir şekilde kurutulmalıdır. Rutubet oranının düşürülmesi, bitkilerin daha uzun süre bozulmadan kalmasına neden olmakta ve toksin üretimini azaltmaktadır. *Fusarium moniliforme* ile yapılan bir çalışmada zaman ve su miktarının mısırdaki Fumonisin B1 üretimi üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Hasat sonrası mısırı kurutarak rutubet içeriğini % 15,5 ve daha aşağılara indiren araştırmacılar mantar gelişiminin olumsuz yönde etkilendiğini ve toksin üretiminin 24-48 saat içerisinde önemli ölçüde düştüğünü bildirmişlerdir (23).

### 2.2.1.2. Sıcaklık

Küfler geniş sıcaklık aralıklarında ürerler ancak genelde her küf türünün kendine özgü optimal üreme sıcaklığı vardır.

Küfler, 10 ile 40 °C'ler arasında üreyebilirler. Genellikle optimum üreme sıcaklığı 20-30 °C arasındadır. *Penicillium* ve *Fusarium* türleri 5 °C'den daha düşük sıcaklık derecelerinde üreyebilmektedir. *Aspergillus* türleri ise 10 ile 45 °C arasında üremekle birlikte, optimum üreme sıcaklıkları 35-38 °C arasındadır. En fazla toksin salgılanması ise 25-30 °C arasında olmaktadır. *Aspergillus* türleri içinde sadece *Aspergillus ochraceus* diğer türlere göre daha düşük sıcaklık derecelerinde (12- 37°C) ürer ve okratoksin A sentezler. Aflatoksinler yüksek sıcaklık derecelerine karşı dayanıklıdır. Parçalanabilmeleri için 300 °C'nin üzerinde sıcaklığa ihtiyaç vardır. Bu yüzden sütlerin pastörize edilmesiyle aflatoksin düzeyinde herhangi bir azalma meydana gelmez. Aflatoksinler pastörizasyona dirençlidirler (13,24).

### 2.2.1.3. Oksijen ve Karbondioksit Miktarı

Mantarlar aerob olduklarından, üremeleri için mutlaka oksijene ihtiyaçları vardır. Ortamdaki oksijen miktarının azaltılması veya karbondioksit miktarının artırılması, küflerin üremesini ve toksin sentezlemelerini olumsuz yönde etkileyen faktörlerdendir. Ortamın karbondioksit yoğunluğunun % 10'dan daha fazla olması ya da oksijen yoğunluğunun % 45'den % 1'e kadar inmesi *Aspergillus flavus*'un üremesini ve aflatoksin sentezini büyük oranda azaltır. Hava değişimi sınırlı, oksijensiz yerlerde depolanan tarım ürünleri, yem ve yem maddelerinde küflenme baskı altında tutulabilir (25).

#### **2.2.1.4. Zaman**

Ürünün depoda kalma süresi ile mikotoksin üretimi arasında doğru bir orantı olduğu düşünülmektedir. Çünkü depolama süresinin uzunluğu üremeye ve mikotoksin sentezinin artmasına neden olmaktadır. Küf sporları ile kontamine bir üründe ilk olarak sıcaklık ve rutubet şartlarının uygun olması durumunda, 2 ile 4 gün arasında küf üremekte ve bu küfler üremeleri sırasında yüksek miktarlarda mikotoksin sentezleyebilmektedirler (7).

#### **2.2.1.5. Mekanik Hasarlar**

Hasat zamanı veya daha sonraki işlemler sırasında kullanılacak veya depolanacak ürünlerin çizilerek, parçalanarak, ezilerek, kırılarak mekanik hasara uğramaları ve küflerin etki edebilecekleri yüzey alanlarının genişlemiş olması, bu tür hasara uğramış ürünlerde küflerin üremesi ve toksin sentezlemelerini kolaylaştırır. Karma yemlerde, yem maddeleri zaten parçalanmış veya ezilmiş halde bulduklarından, bu durum yemlerin küflenmelerini ve mikotoksinlerle kontaminasyonu kolaylaştırır (1,14).

#### **2.2.1.6. pH**

Küfler pH 2-11 gibi geniş bir aralıkta üreyebilmektedirler. Optimum üredikleri pH değeri 5-6 arasındadır, ancak küfler asit ortamlarda daha iyi üreyebilmektedirler. *Aspergillus* türleri optimum pH:5'de üremekle birlikte, pH 2.5 - 6 arasında olan ortamlarda toksin sentezleyebilmektedirler (26).

#### **2.2.1.7. Diğer Faktörler**

Ortamda birden fazla küf türünün bulunması, tarlada yetişen ürünlerin zamanında hasat edilmemesi, iklim şartlarının yağışlı ve rutubetli olması, depolardaki gıdaların az miktarda ışık alması, havalandırmasının yetersiz olması gibi faktörler küflerin üremesine ve mikotoksin sentezine etki eden diğer faktörlerdir (27).

#### **2.2.2. Kimyasal Faktörler**

Fungusitler, mantar kontaminasyonlarının ve infeksiyonlarının en aza indirilmesi amacıyla kullanılırlar. Bu durum kontaminasyon riskini düşüren bir faktör olsa bile, yapılan bazı araştırmalar, fungusitlerin öldürücü dozun altındaki dozlarda kullanıldıklarında mikotoksin üretimini artırabileceklerini göstermiştir. Örneğin

Fenpropimorph adlı fungusitin *A. parasiticus* tarafından salgılanan AFB1 ve AFG1 üretimini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (28).

### **2.2.3. Biyolojik Faktörler**

Mikotoksin oluşturan mantarların büyük bir çoğunluğu bitkilerde patojen olarak yaşarlar. Mikotoksin oluşumu için öncelikle mantarların üremesi gerekir. Mantarların üreyerek mikotoksin oluşturması için de biyolojik bir konağa ihtiyaç vardır. Üremenin gerçekleşebilmesi için ortamda mutlaka organik madde ve suyun bulunması gerekir. Mantar sayısının artması toksin oluşumunu artırır. Mikotoksin üretimi ile infeksiyon düzeyi arasında bir ilişki vardır. Tahıllar mantar kontaminasyonu için daha uygundur. Ilıman iklim kuşaklarında tahıllarda bulunan yüksek düzeyde deoksinivalenol (DON)'un buğdayın baş kısımlarında, *Fusarium*'un sebep olduğu yanık infeksiyonunun şiddetini artırdığı bildirilmiştir. Bitki türü mantar üremesini etkilemektedir (15).

### **2.3. Başlıca Mikotoksinler**

Besin ve yemlerde bulunabilen, insan ve hayvan sağlığı yönünden önem taşıyan başlıca mikotoksinler, kaynakları, hedef organ ve dokularda oluşturdukları etkileri Tablo 1' de özetlenmiştir.

**Tablo 2-2-1: Başlıca mikotoksin türleri, mitotoksin oluşturan mantarlar, kaynakları ve hedef organ ve dokularda oluşturdıkları etkileri (29)**

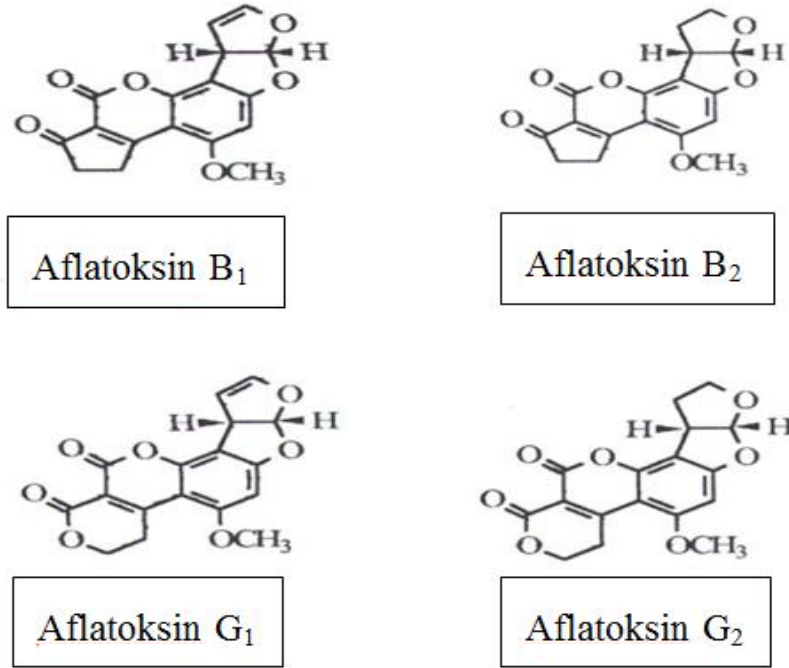
Mikotoksin türü	Üretildiği mantar	Kaynak maddeler	Organ ve Dokuda Oluşturdıkları Etkiler
Aflatoksinler	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A.parasiticus</i>	Yer fıstığı, pirinç, mısır, fındık, pamuk tohumu, süt, peynir, buğday	Karaciğer ve böbrekte karsinom, safra yolları proliferasyon ve karaciğerde yağlanma
Sterigmatosistin	<i>A. versicolor</i>	Tahıllarda	Ratlarda hepatom
Okrotoksin	<i>A. ochraceus</i>	Tahıllarda	Ratlarda karaciğer ve böbrekte patolojik bozukluklar
Aspergillik asit	<i>A. flavus</i>	Tahıllarda	Farelerde toksikolojik bozukluklar
Kojic asit	<i>A. flavus</i> ve diğer türleri	Tahıllarda	Memelilerde toksik bozukluklar
Tremorjenik toksin	<i>A.flavus</i>	Mısır ve diğer ürünler	Farelerde tremorlar
Luteosikrin	<i>Penicillium islandicum</i>	Pirinç	Karaciğerde hepatom
Rugulosin	<i>P. rugulosum</i>	Pirinç	Karaciğer ve böbrekte bozukluklar
Chlorine	<i>P. islandicum</i>	Pirinç	Hayvanlarda karaciğerde hepatom
Citrinin	<i>P. citrinum</i>	Pirinç	Hayvanlarda nefropati olayları
Citreoviridin	<i>P. citrioviride</i> ve diğer türleri	Pirinç	Memelilerde felç
Rubratoksin	<i>P. rubrum</i>	Mısır	Ratlarda karaciğerde yağlanma
Patulin	<i>P. expansum</i> <i>P.clavatus</i>	Pirinç ve diğer ürünler	Ratlarda karsinojenik etkiler
Penicillik asit	<i>P. puberulum</i> <i>P. cyclopium</i>	Mısır	Ratlarda karsinojenik etkiler
Cyclopiazonic asit	<i>P. cyclopium</i>	Çeşitli ürünlerde	Konvilziyon, dalak ve böbrekte lezyonlar
Stachybotrys	<i>Stachybotrys atra</i> . <i>Stach. Alternans</i>	Özellikle samanda	Dermatitisle komplike Stachyobotritoksikosis.
Diacetoxyscripenol	<i>Fusarium scirpi</i> . <i>F. tricinctum</i>	Buğday, mısır, yulaf, çavdar	Ratlarda deride nekroz ve gözlerde bozukluklar
T-2 Toksin	<i>F. tricinctum</i> <i>F. nivale</i>	Mısırdaki ve tahıllarda	Ratlarda epidermal dokularda nekroz
Nivalenol (DON)	<i>F. nivale</i>	Pirinç	DNA sentezinin inhibisyonu
Zearalenone	<i>F. graminearum</i>	Mısır, arpa ve diğer ürünler	Hiper östrojenik etkiler
Sporidesminler	<i>Pithomyces</i>	Meralarda	Hayvanlarda ekzama ile karakterize bozukluklar

Mantarların mikotoksin sentezlenmesi için gıda maddelerini kontamine edip, üremeleri gerekir. Mantarların bir kısmı uygun koşullar altında üreyip, toksik etki gösteren sekonder metabolitlerini (mikotoksinlerini) salgırlar. Sentezlenen bu mikotoksinlerden bir kısmı insan ve hayvanlarda mikotoksikoza neden olur. Mikotoksinler, kuru saklama koşullarına dayanıklı olup, aylarca hatta yıllarca toksik özelliklerini koruyabilmektedirler. Mikotoksinler sığağa karşı çok dayanıklı olduklarından buldukları gıdaların pişirilmesiyle parçalanamazlar. Ayrıca, mantarlar canlılıklarını yitirdikten sonra da yem ve besinlerde uzun süre kalırlar ve insan sağlığı açısından yüksek oranda tehdit oluştururlar (2).

Bu zamana kadar 400'den fazla mikotoksin varlığı gösterilmiş ancak kirlenmiş tarımsal gıda ürünlerinde daha yaygın olan en önemli mikotoksinler, aflatoksin (AF), okratoksin A (OTA), trikotesenler, zeranol (ZEN), patulin, siklopiazonik asit (CPA) ve fumonisin (FB) olarak bildirilmiştir (30,31)

### 2.3.1. Aflatoksinler

Aflatoksinlerin B1, B2, G1, G2, M1, M2 olmak üzere altı ana bileşigi vardır ve *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen toksik metabolitlerdir (32). *A. parasiticus* AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2, *A. flavus* nadiren AFG1 ve AFG2 üretmektedir. Aflatoksinler kimyasal yapılarına göre, difurokumarosiklopentenon ve difurokumarolakton grubunda bulunan toksinlerdir. İlk keşfinden sonra aflatoksinin tek bir bileşik olduğu düşünülmüş, ancak daha sonra ince tabaka kromatografisi (TLC) ile yapılan çalışmalarda aflatoksinin aslında dört farklı bileşik olduğu tespit edilmiştir. Ultraviyole ışığı altında mavi renk verenler aflatoksin B1 (AFB1) ve aflatoksin B2 (AFB2), sarı-yeşil renk verenler ise aflatoksin G1 (AFG1) ve aflatoksin G2 (AFG2) olarak isimlendirilmiştir. Aflatoksin içeren yemleri tüketen hayvanların sütlerinde yeni bir aflatoksin bileşiginin olduğu tespit edilmiş ve bu toksin sütte bulunduğu için aflatoksin M yani süt toksini (Milk toxin) adı verilmiştir. Aflatoksin M'nin keşfinden sonra yapılan çalışmalarda, süt toksininin hayvanların kontamine yemler ile aldıkları aflatoksin B1 ve aflatoksin B2' nin 4-hidroksi türevi iki ayrı bileşik olduğu anlaşılmış ve aflatoksin M1 ve aflatoksin M2 olmak üzere yeni iki farklı bileşik bulunmuştur (20,30,31).



**Şekil 2-1: Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları**

Hemen her yaşta, özellikle anne sütü bırakıldıktan sonra bebekler ve küçük çocuklar tarafından sıklıkla tüketilen sütte bulunan, halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturan aflatoksin M1 pastörizasyon işlemlerine karşı dayanıklı olup rutin dezenfeksiyon işlemlerinden etkilenmemektedir. Bu yüzden pek çok ülke süt ve süt ürünlerinde AFM1 düzeylerini kontrol etmektedir. Yasal limitten fazla toksin saptanan süt ve süt ürünlerinin piyasaya sunulmasına ve tüketilmesine izin verilmemektedir. Bu toksinin sütteki tolerans limiti ülkeden ülkeye değişkenlik gösterebilmektedir (33,34). Tablo 2-2’de farklı ülkelere ait süt ve süt ürünlerindeki AFM1 tolerans limitleri gösterilmiştir.

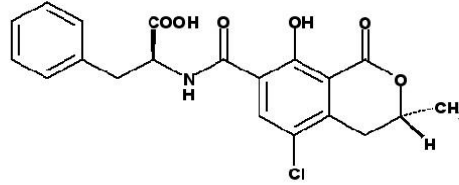
**Tablo 2-2: AFM1 için süt ve süt ürünlerindeki uluslararası sınırlar (30)**

Ülke	Çiğ Süt (µg/kg)	Süt ürünleri türevleri (µg/kg)
AVRUPA BİRLİĞİ	0.05	0.05
Almanya	0.05	-
Belçika	0.05	-
İtalya	-	0.01 (çocuk gıdaları için)
İsveç	-	0.05 (sıvı süt gıdaları)
Uruguay	0.5	0.5
Barbados	0.005	-
Kıbrıs	0.5	0.5
Moritus	10	10
Avusturya	-	-
	0.05, 0.01 (pastörize bebek sütü)	0.02 (yağ), 0.25 (peynir), 0.40 (süt tozu)
Fransa	0.05, 0.03 (3 yaşından küçük çocuklar için)	0.05, 0.03 (3 yaşından küçük çocuklar için) (süt tozu)
İsviçre	0.05	0.025 (Peynir altı suyu ve ürünleri), 0.25 (peynir), 0.02 (yağ), 0.10 (süt tozu)
Bulgaristan	0.50	0.1 (süt tozu), 0 (süt tozu ve bebek mamaları), 0.02 (bebek mamaları)
Romanya	0	-
Çek Cumhuriyeti	0.50	5, 0,1 (bebek mamaları)
Avrupa Üniversiteler Birliği	-	0.50
Brezilya	-	0.50 (sıvı süt), 5.0 (süt tozu), 2.5 g/kg (peynir)
Arjantin	0.05	0.50, 0.05 (süt tozu)
Honduras	0.05	0.25 (peynir), 0.02 (bebek mamaları)
Nijerya	1	-
Mısır	0	0
Türkiye	0.05	0.25 (peynir)
GÜNEY ORTAK PAZARI	0.5	5.0 (süt tozu)

### 2.3.2. Okratoksinler

Genellikle *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus cinsine* ait küflerin farklı türleri tarafından üretilen toksik metabolitlerdir. Okratoksinler içerisinde en toksik olanı renksiz ve kristalize özellikteki Okratoksin A (OTA)'dır. OTA nefrotoksik özellik gösterir ve böbrek hasarı, karaciğer nekrozu başta olmak üzere bir çok önemli toksik hastalığa neden olmaktadır. Hayvanlarda akut, subakut ve kronik zehirlenmelere neden olan OTA aynı zamanda, karsinojenik, teratojenik, immunotoksik ve mutajenik etkilere

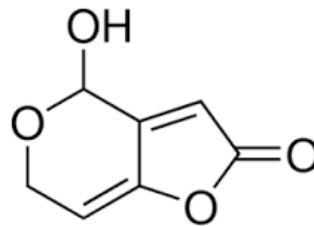
de sebep olur. OTA ile kontamine ürün tüketimi sonucu ortaya çıkan zehirlenmede başlıca hedef organı böbreklerdir. Bu nedenle akut veya kronik tipte zehirlenen hayvanlarda tipik olarak akut ve kronik nefropati gelişmesi gözlemlenir (35,36).



Şekil 2-2: OTA'nın kimyasal yapısı

### 2.3.3. Patulin

*Penicillium expansum*, *Penicillium patulum* ve *Aspergillus clavatus* başta olmak üzere, bir çok mantar türü tarafından üretilen bir mikotoksin çeşitidir. Bu yüzden doğada yaygın olarak bulunurlar. Patulin bazik ortamlarda kolayca parçalanabilir, ancak elma, şeftali gibi meyve özlerinde ve bu meyvelerin suları gibi asidik ortamlara daha dayanıklıdır. Bu sebeple patuline genellikle meyve sularında rastlanılır. Patulin ile kontamine besin maddesi tüketen hayvanlarda öncelikli olarak beyin kanaması ve ödemi ve sinirsel belirtiler görülür (37).

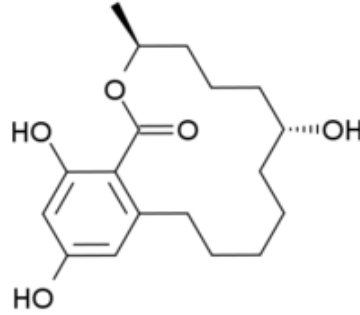


Şekil 2-3: Patulinin kimyasal yapısı

### 2.3.4. Zeranol

*Fusarium tricinctum* ve *Fusarium graminearum* gibi *Fusarium* türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. Zeranol (ZEN) mısır, yulaf, buğday, saman gibi yemlerde bulunmaktadır. En çok kontaminsayona mısırdaki rastlanır. Tarlada veya depolama sırasında kolaylıkla toksin oluşabilir. ZEN beyaz renkte, östrojenik etkili bir

mikotoksindir. Az miktarda ZEN içeren yemlerin uzun süre dişi hayvanlara verilmesiyle vajinal akıntılarının artması, vulva ve vajinanın şişip kızarması, vajinanın geriye doğru çıkması, memelerin büyümesi, uterus kanaması, kızgınlık hali, kısırılık, yavru atma gibi semptomlar görülebilir (38).



**Şekil 2-4: ZEN'in kimyasal yapısı**

Sütleri tüketilen hayvanların yemlerle beraber aldıkları AFB1'in hangi oranlarda AFM1'e dönüştüğünü saptamak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda farklı sonuçlar elde edilmekle birlikte genel olarak, tüketilen yemdeki AFB1'in % 1-3 arasında değişen oranlarda süte geçtiği bildirilmiştir. AFB1'in AFM1'e dönüşüm oranının, hayvandan hayvana, günden güne, bir laktasyon döneminden diğerine, sağım zamanına, sağım aralığına ve hayvanın süt verim düzeyine bağlı olarak değişebilir (39,40).

#### **2.4. Mikotoksinlerin Tanı Yöntemleri**

İnsan ve hayvanlarda meydana gelen akut ya da kronik tipteki mikotoksikoz başka hastalıklar ile karıştırılabilir. Mikotoksikozun diğer hastalıklardan ayırt edilebilmesi için uygun yöntemlerle analiz edilmesi gereklidir. Gıda güvenliğinin sağlanması ve gıda kökenli zehirlenmelerin kontrol altına alınması için mikotoksin teşhisi büyük önem taşımaktadır. Bu sebepten değişik analiz yöntemleri geliştirilmiştir ve bu yöntemlerin bazı özellikler taşınması beklenir (41,42).

Bu analiz yöntemlerinin,

- Duyarlılığı yüksek olmalıdır.
- Hangi toksin araştırılıyorsa o toksine karşı yüksek uyum göstermeli ve yanılmalara neden olmamalıdır.

- Yöntem çok sayıdaki maddeye uygulanabilmelidir (bitki, yem, süt vb).
- Yapılan işlemler çok sayıda toksinin analizine olanak sağlamalıdır.
- Uygulanması basit olmalı ve zaman almamalıdır.
- Pahalı olmamalıdır.

Özellikle rutin işlemlerde, çok sayıda örneğin analiz edilebileceği düşünülerek yöntemin fazla zaman almaması ve ucuz olması önemlidir.

Toksin zehirlenmelerinin kontrolünü sağlamak için gıda maddelerinde bulunan mikotoksinlerin seviyelerinin belirlenmesi çok önemlidir. Bu nedenle de gıda maddelerinde toksin analizini sağlayan duyarlı ve kesin sonuç veren yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemleri fiziksel muayene, kimyasal yöntemler ve biyolojik analiz yöntemleri olmak üzere üç ana başlığa ayırmak mümkündür.

**Fiziksel muayene**, mikotoksinlerin tanısında rol almaz, ancak mikotoksin riskinin olup olmadığı hakkında fikir sahibi olmamızı sağlar. Örneğin, yemlerde küfün gözlenmesi, oluşan renk değişiklikleri, nem oranı, gıdaların normal görünümünü kaybetmeleri gibi durumlar yemlerin ve gıda maddelerinin mikotoksin ile kontamine olmuş olabileceklerini akla getirmektedir (16).

**Kimyasal yöntemler**, mikotoksinlerin analizinde önemli rol oynar. Bulunduğu maddeden ayrıştırılmış ve kirliliklerden tamamen uzaklaştırılmış örnekler için kromatografik yöntemler kullanılır. Bu yöntemin esası analiz edilen bileşiklerin fiziksel-kimyasal özelliklerine dayanmaktadır. Maddelerin, buldukları ortamlarda farklı dağılım göstermesiyle birbirlerinden ayrılması ve tanınması işlemidir. Kromatografi yöntemleri temizleme ve analiz işlemlerinde kullanılmaktadır. Aflatoksinlerin analizinde Kolon Kromatografisi, İnce Tabaka Kromatografisi (İTK, TLC), Gaz Kromatografisi (GC) ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK, HPLC) kullanılmaktadır. (39,41,43).

Kimyasal yöntemlerden bazıları, İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Kolon Kromatografisi, Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS), Enzim Aktivitesine Bağlı İmmunoteknik (Enzyme Multiplied Immunoassay/EMIT) ve Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant Yöntemi (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemleri örnek verilebilir. Şimdiye kadar bütün mikotoksin türleri için uygulanabilecek tek bir analiz yöntemi bulunamamıştır. Analiz yöntemleri mikotoksin türüne ve analiz edilecek besinin cinsine göre değişiklikler göstermektedir. (14,16).

İmmünokimyasal yöntemlerde antijen ve antikor etkileşimlerinden yararlanılır. Mikotoksinlerin belirlenmesinde Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sıklıkla kullanılan bir immünokimyasal yöntemdir. ELISA'nın kromatografik yöntemlere göre üstünlükleri,

- ✓ Fazla sayıda örnek çok kısa bir süre içerisinde işlenebilmektedir.
- ✓ Bazı örnekler doğrudan (işlenmeden) kullanılabilir (serum, süt vb).
- ✓ Duyarlılığı yüksektir.
- ✓ Diğer yöntemlere göre daha ucuzdur.

ELISA yönteminde sıvı örnekler ile direkt olarak çalışılabilirken, peynir, yem gibi katı maddeler ayrıştırma, saflaştırma işlemlerine tabi tutulmalıdır. Bu yöntemin dezavantajı, mikotoksin çeşitleri veya aynı tür mikotoksinler arasında çapraz reaksiyonun gözlenmesidir. Çapraz reaksiyonlar sonuçlarda az da olsa yanılgılara sebep olabilir.

ELISA yöntemi antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak esasına dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir. Antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aranabilir. Kompetatif ELISA yönteminde, yüzeyi araştırılan toksine karşı spesifik antikorlarla kaplanmış plaklar kullanılmaktadır. Yöntemin çalışma prensibi serbest ve işaretlenmiş antijenlerin antikorlara karşı yarışması temeline dayanmaktadır. Sonuçlar standart gruplarla kıyaslanarak değerlendirilir (13,17).

**Biyolojik analiz yöntemleri**, canlı materyaller üzerinde yapılan analiz yöntemleridir. Bu yöntemler ise toksinlerin hücreler üzerindeki zararlı etkilerine dayanır. Bu zararlı etkiler bir veya birden fazla mikotoksin ve kimyasal maddelerden kaynaklanabilir. Bu yüzden mikotoksinlerin kesin teşhisi için biyolojik yöntemler tek başına yeterli değildir. Eğer etken maddenin toksin olup olmadığı bilinmiyorsa biyolojik analiz yöntemlerine başvuru bilinir. Eğer etken mikotoksin biliniyor ve bu mikotoksine uygun bir analiz yöntemi var ise, analizde kimyasal yöntemler kullanılmalıdır. Kimyasal yöntemler, çok az miktarlardaki mikotoksinlerin analizinde de kullanılmaktadır. Bu sebeple biyolojik analiz yöntemleri, immünokimyasal yöntemler ve kromatografi kadar sıklıkla kullanılmamaktadır (43).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Süt Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada, İstanbul ilinin farklı marketlerinden alınan farklı lot numaralarına sahip farklı markalarda 75 adet UHT ve 75 adet pastörize günlük süt kullanılmıştır.

#### 3.2. Kit İçeriği

Ölçüm amacıyla Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121) test kitleri kullanılmıştır (Şekil 3-1). Kullanılan ELISA kitinin içeriğinde konjugat, standart solüsyonları, substrat kromojen, stop solüsyonu, buffer 1, buffer 2, yıkama solüsyonu hazır halde yer almıştır. Bir adet Ridascreen kitiyle standartlar dahil, toplam 48 örnekte AFM1 düzeyi analiz edilmiştir.



**Şekil 3-1: Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121) test kiti**

#### 3.3. Analizlerde Kullanılan Cihazlar, Araç ve Gereçler

- Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 (Darmstadt/Germany) (Art No: R1121)
- Spektrofotometre (ELx800 BioTek Instruments Inc, USA)
- Santrifüj (Heraeus Megafuge 1.0, Germany)
- Tek kullanımlık 3 mL'lik PE tüp
- Tek kullanımlık 15 mL'lik Falcon tüp
- Steril pipet uçları (Eppendorf, Hamburg/Germany)
- Pastör pipeti (20 – 200 µL, 200 – 1000 µL)

- ELISA Yıkama cihazı (CIOM CA-200, China)

### 3.4. Sütlerin Analize Hazırlanması

15 mL'lik Falcon tüplere alınan süt örnekleri yağ tabakalarından ayrılması için 3500 rpm'de 10 dakika 10°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan ve üst tarafta kalan krema tabakası Pastör pipeti yardımıyla süt örneklerinden tamamen ayrılmıştır. Yağı alınan 2 mL'lik süt örnekleri PE tüplere alınmıştır. Mikroplaktaki her kuyucuk için 100 µL süt örneği kullanılmıştır (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Kullanılan süt örneklerinin hazırlanması

### 3.5. Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması

Kit içerisinde hazır toz halinde çıkan yıkama tuzunun üzerine kullanım talimatına göre 1 Lt. distile su eklenmiş ve karışım homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan bu çözelti mikroplakların yıkanmasında kullanılmıştır.

### 3.6. Testin Uygulanması

- Her bir kit için standartlar ve süt örnekleri 2 kez çalışılmıştır. Mikroplakların ilk 12 kuyusu 6 standart için ayrıldıktan sonra diğer kuyular da örnekler için kullanılmıştır.
- Her bir kuyuya 100 µL antikor solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra plaklar hafifçe çalkalandı ve 15 dakika oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

- Her standarttan 2 kez olacak şekilde ilk 12 kuyucuğa 100 µL standart solüsyonları eklenmiştir. Geri kalan kuyucuklara her süt örneğinden 2 defa 100 µL eklenmiştir.
- Plaklar hafifçe çalkalanmış ve oda sıcaklığında (25 °C), karanlık ortamda, 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- Her bir kuyucuğa 100 µL konjugat solüsyonu eklenmiş, plaklar hafifçe çalkalanmış ve oda sıcaklığında (25 °C), karanlık ortamda, 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyucuk 250 µL yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- Her bir kuyucuğa 100 µL substrat-kromojen solüsyonu eklenmiş, plaklar hafifçe çalkalanmış ve oda sıcaklığında (25 °C), karanlık ortamda, 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu eklenmiş, plaklar hafifçe çalkalanmış ve örnek 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede analiz edilmiştir.

Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda analiz edilen süt örneklerinden alınan sonuçların ortalama absorbans değerlerinin hesaplanması için Remark yöntemi kullanılmıştır (3-1).

**Remark hesaplaması;**  $\frac{\text{Standart veya örneklerin absorbansı}}{\text{sıfır standart absorbansı}} \times 100 = \% \text{ Absorbans}$  (3-1)

Burada, sıfır standartı %100' e eşittir ve absorbans değerleri yüzde değer olarak kaydedilir.

Örneklere elde edilen absorbans değerleri standart absorbans eğrisine göre değerlendirilmiştir.

#### 4. BULGULAR

İstanbul'un çeşitli süper marketlerinden toplanan farklı lot numaralarına ait 75 UHT süt örneğinde belirlenen AFM1 düzeyleri Tablo 4-1 de, belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı ise 1. plakta 40, ikinci plakta 35 örnek olacak şekilde Tablo 4-2 ve Tablo 4-3' de gösterilmiştir.

**Tablo 4-1: Farklı lot numaralı UHT süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeyleri (ng/L)**

SMP1	8,1	SMP16	10,3	SMP31	13,4	SMP46	8,3	SMP61	8,3
SMP2	88,2	SMP17	54,4	SMP32	11,4	SMP47	6,1	SMP62	8,4
SMP3	11,5	SMP18	18,4	SMP33	0,0	SMP48	6,9	SMP63	9,5
SMP4	11,3	SMP19	9,4	SMP34	0,0	SMP49	7,8	SMP64	7,5
SMP5	8,4	SMP20	8,0	SMP35	13,4	SMP50	9,6	SMP65	7,7
SMP6	8,9	SMP21	8,5	SMP36	6,7	SMP51	7,9	SMP66	8,2
SMP7	8,5	SMP22	9,0	SMP37	0,0	SMP52	8,0	SMP67	9,7
SMP8	6,1	SMP23	10,3	SMP38	4,6	SMP53	13,6	SMP68	10,4
SMP9	19,5	SMP24	8,0	SMP39	6,5	SMP54	7,5	SMP69	11,8
SMP10	13,0	SMP25	0,0	SMP40	0,0	SMP55	7,7	SMP70	9,2
SMP11	16,1	SMP26	16,4	SMP41	7,0	SMP56	7,7	SMP71	15,4
SMP12	0,0	SMP27	6,2	SMP42	30,8	SMP57	7,4	SMP72	12,1
SMP13	9,7	SMP28	6,7	SMP43	7,7	SMP58	8,9	SMP73	12,2
SMP14	31,3	SMP29	14,6	SMP44	6,7	SMP59	12,7	SMP74	13,3
SMP15	55,0	SMP30	31,7	SMP45	6,9	SMP60	8,0	SMP75	12,5

Yeşil ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 1. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 0,00-5,00 ng/L AFM1 saptanmış 7 örneği göstermektedir (%9,3). Sarı ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 2. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 5,00-10,00 ng/L AFM1 saptanmış 40 örneği göstermektedir (%53,3). Kırmızı ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 3. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 10,00-20,00 ng/L AFM1 saptanmış 22 örneği göstermektedir (%29,3). Mavi ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 4. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 20,00-40,00 ng/L AFM1 saptanmış 3 örneği göstermektedir (%4). Lacivert ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 5. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 40,00-80,00 ng/L AFM1 saptanmış 2 örneği göstermektedir (%2,6). Bordo ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 6. Standart solüsyonunun referans aralığı olan >80,00 ng/L AFM1 saptanmış 1 örneği göstermektedir (%1,3).

**Tablo 4-2: UHT süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı**

**UHT SÜT ÖRNEKLERİ 1. PLAK**

Standartlara göre AFM1 düzeyi	Elde edilen AFM1 düzeyi									TOPLAM Örnek Sayısı	
0,00 - 5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,60			7
5,01 - 10,00	6,10	6,20	6,50	6,70	6,70	8,00	8,00	8,10	8,40		15
	8,50	8,50	8,90	9,00	9,40	9,70					
10,01 - 20,00	10,30	10,31	11,30	11,40	11,50	13,01	13,40	13,40	14,60		13
	16,10	16,40	18,40	19,50							
20,01 - 40,00	31,30	31,70									2
40,01 - 80,00	54,40	55,00									2
> 80,00	88,20										1

**Tablo 4-3: UHT süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı**

**UHT SÜT ÖRNEKLERİ 2. PLAK**

Standartlara göre AFM1 düzeyi	Elde edilen AFM1 düzeyi									TOPLAM Örnek Sayısı
0,00 - 5,00	-									0
5,01 - 10,00	6,10	6,70	6,90	6,90	7,00	7,40	7,50	7,50	7,70	25
	7,70	7,70	7,70	7,80	7,90	8,00	8,00	8,20	8,30	
	8,30	8,40	8,90	9,20	9,50	9,60	9,70			
10,01 - 20,00	10,40	11,80	12,10	12,20	12,50	12,70	13,30	13,60	15,40	9
20,01 - 40,00	30,80									1
40,01 - 80,00	-									0
> 80,00	-									0

Çalışılan 75 UHT süt örneğinin 69' unda (%92) farklı düzeylerde AFM1 varlığı saptanırken, bu süt örneklerinin 3'ünde (%4) yasal sınırın aşıldığı (sırasıyla 88.2 ng/L, 55.0 ng/L ve 54.4 ng/L) belirlenmiş ve 6 (%8) örnekte toksine rastlanmamıştır.

İstanbul'un çeşitli süper marketlerinden toplanan farklı lot numaralarına ait 75 pastörize günlük süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeyleri Tablo 4-4'da, belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı ise 1. plakta 40, ikinci plakta 35 örnek olacak şekilde Tablo 4-5 ve Tablo 4-6' de gösterilmiştir.

**Tablo 4-4: Farklı lot numaralı pastörize günlük süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeyleri (ng/L)**

SMP1	6,89	SMP16	2,03	SMP31	13,12	SMP46	8,40	SMP61	3,48
SMP2	7,90	SMP17	6,40	SMP32	8,78	SMP47	7,56	SMP62	14,42
SMP3	10,39	SMP18	4,85	SMP33	8,12	SMP48	7,95	SMP63	13,30
SMP4	7,25	SMP19	8,49	SMP34	11,03	SMP49	7,29	SMP64	15,03
SMP5	10,55	SMP20	8,73	SMP35	9,94	SMP50	4,76	SMP65	14,49
SMP6	12,90	SMP21	6,45	SMP36	8,66	SMP51	4,15	SMP66	15,69
SMP7	7,78	SMP22	9,42	SMP37	12,73	SMP52	7,80	SMP67	13,69
SMP8	9,91	SMP23	9,87	SMP38	17,88	SMP53	1,59	SMP68	5,68
SMP9	12,97	SMP24	8,71	SMP39	16,56	SMP54	4,87	SMP69	11,52
SMP10	10,14	SMP25	7,60	SMP40	4,71	SMP55	9,21	SMP70	11,09
SMP11	9,02	SMP26	10,44	SMP41	5,55	SMP56	11,32	SMP71	10,52
SMP12	9,09	SMP27	9,68	SMP42	6,23	SMP57	5,33	SMP72	15,33
SMP13	9,84	SMP28	5,61	SMP43	7,29	SMP58	6,23	SMP73	17,03
SMP14	9,77	SMP29	7,12	SMP44	5,43	SMP59	3,04	SMP74	16,77
SMP15	9,28	SMP30	10,89	SMP45	1,49	SMP60	3,13	SMP75	7,31

Tablo 4-4'te belirtildiği üzere yeşil ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 1. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 0,00-5,00 ng/L AFM1 saptanmış 11 örneği göstermektedir (%14,6). Sarı ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 2. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 5,00-10,00 ng/L AFM1 saptanmış 39 örneği göstermektedir (%52). Kırmızı ile gösterilen örnekler kit içeriğinde 3. Standart solüsyonunun referans aralığı olan 10,00-20,00 ng/L AFM1 saptanmış 25 örneği göstermektedir (%33,3). Kullanılan 75 pastörize günlük süt örneğinin tamamında farklı düzeylerde AFM1'e rastlanmış ancak 4., 5. ve 6. standartların referans aralığı olan 20,00->80,00 ng/L aralıklarında herhangi bir örnek saptanmamıştır.

**Tablo 4-5: Pastörize günlük süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı**

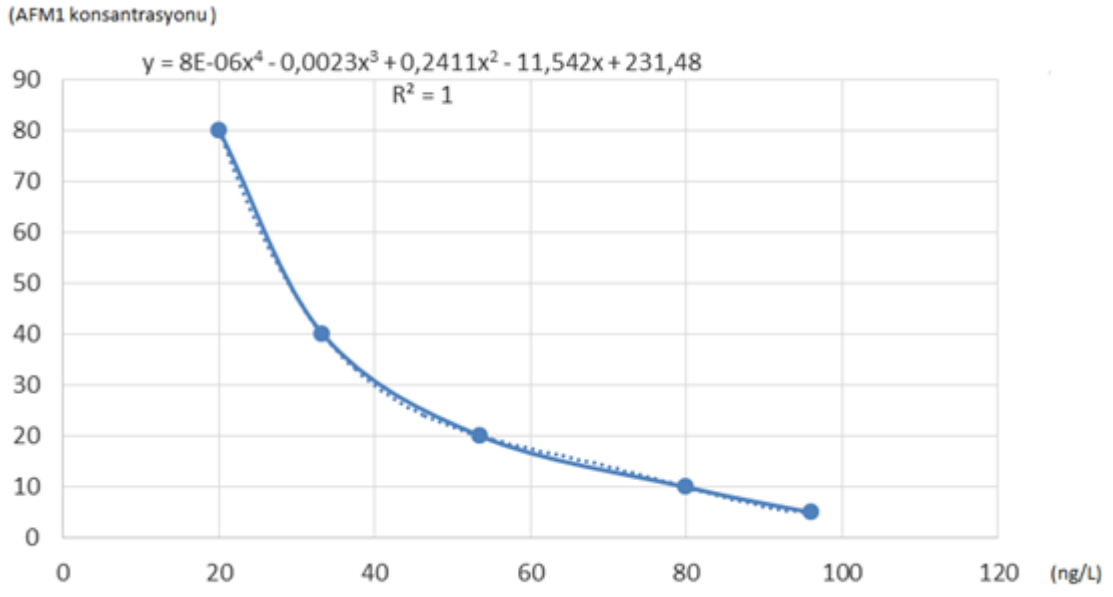
PASTÖRİZE GÜNLÜK SÜT ÖRNEKLERİ 1. PLAK											
Standartlara göre AFM1 düzeyi	Elde edilen AFM1 düzeyi									TOPLAM Örnek Sayısı	
0,00 - 5,00	2,03	4,71	4,85								3
5,01 - 10,00	5,61	6,40	6,45	6,89	7,12	7,25	7,60	7,78	7,90	25	
	8,12	8,49	8,66	8,71	8,73	8,78	9,02	9,09	9,28		
	9,42	9,68	9,77	9,84	9,87	9,91	9,94				
10,01 - 20,00	10,39	10,14	10,44	10,55	10,89	11,33	12,73	12,90	12,97	12	
	13,12	16,56	17,88								
20,01 - 40,00	-									0	
40,01 - 80,00	-									0	
> 80,00	-									0	

**Tablo 4-6: Pastörize günlük süt örneklerinde belirlenen AFM1 düzeylerinin standart aralıklarına göre dağılımı**

PASTÖRİZE GÜNLÜK SÜT ÖRNEKLERİ 2. PLAK										
Standartlara göre AFM1 düzeyi	Elde edilen AFM1 düzeyi									TOPLAM Örnek Sayısı
0,00 - 5,00	1,49	1,59	3,04	3,13	3,48	4,15	4,76	4,87		8
5,01 - 10,00	5,33	5,43	5,55	5,68	6,23	6,23	7,29	7,29	7,31	14
	7,56	7,80	7,95	8,40	9,21					
10,01 - 20,00	10,52	11,09	11,32	11,52	13,30	13,69	14,42	14,49	15,03	13
	15,33	15,69	16,77	17,03						
20,01 - 40,00	-									0
40,01 - 80,00	-									0
> 80,00	-									0

Tüm örnekler değerlendirildiğinde, 150 süt örneğinin 144'ünün (%96) çeşitli düzeylerde AFM1 ile kontamine olduğu, 3'ünün (%2) yasal sınırın üzerinde toksin içerdiği ve 6'sının (%4) toksin içermediği belirlenmiştir.

Kullanılan toplam 150 süt örneğinde belirlenen AFM1 düzeyleri, AFM1 standart eğrisine göre hesaplanmış olup, çalışmanın sonucunda oluşan grafik, standart eğrisiyle neredeyse %100 çakışmıştır. Bu durum kullanılan tüm kitlerin doğru çalıştığını göstermiştir (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Standart eğrisi

## 5. TARTIŞMA

AFM1 ile kontamine olmuş süt ve süt ürünlerini tüketmek zaman içerisinde insan sağlığını tehdit edecek sonuçlar doğurmaktadır. Pastörizasyon gibi yüksek ısı işlemlere dayanaklı olan AFM1 ile kontamine olmuş sütlerin kullanılmasıyla elde edilen süt ürünlerinde de AFM1 değişmeden kalmaktadır. Bu nedenle AFM1 ile kontamine olmuş süt ve farklı ürünler için, farklı yasal toksin sınırları belirlenmiştir (30,33).

Dünya genelinde, hemen hemen her yaşta tüketilen, özellikle anne sütü bırakıldıktan sonra kullanım sıklığı çocuklar tarafından artan, vücudumuzun kalsiyum ihtiyacının büyük bir çoğunluğunu karşılayan süt ve süt ürünlerinde AFM1 varlığı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır.

Zheng ve ark., Çin'in 25 farklı kentinden temmuz ve eylül aylarında 153 UHT süt örneği toplamışlardır. Temmuz ayında topladıkları 60 UHT süt örneğinin 40'nın (%66) AFM1 ile kontamine ve bunların 5'inde (%8) miktarın yasal sınırın üzerinde olduğunu, eylül ayında topladıkları 93 UHT süt örneğinin 44'ünün (%47) AFM1 ile kontamine ve bunlardan 26'sında (%28) yasal sınırın üzerinde AFM1 olduğunu belirlemişler ve toplamda kullanılan süt örneklerinin %54.9'unun AFM1 ile kontamine olduğunu ve bunların %20.3'ünde toksin düzeyinin yasal sınırın üzerinde olduğunu bildirmişlerdir (44).

Santos ve ark., Brezilya'nın Londrina, Parana ve Brazil eyaletlerinden topladıkları 42 UHT süt örneğiyle yaptıkları çalışmada bütün süt örneklerinin AFM1 ile kontamine olduğunu (0.01-0.81µg/kg), ancak bu süt örneklerinden hiçbirinin Brezilya Mevzuatına göre yasal sınır olan 0.5µg/kg değerini aşmadığını belirlemişlerdir (45).

Portekiz'de Martins ve ark., haziran-eylül döneminde Lisbon'un farklı süpermarketlerinden topladıkları 70 UHT süt örneği ile çalışmışlar ve örneklerin %84.2'sinin AFM1 ile kontamine olduğunu, bu örneklerin ise sadece 2'sinin (0.059µg/L, 0.061µg/L) toksin düzeyinin yasal sınırı (0.05µg/L) aştığını bulmuşlardır (46).

İtalya'da yapılan bir başka çalışmada ise, Santini ve ark., çalıştıkları 12 UHT süt örneğinin %41,7 sinde AFM1 varlığı gözlemişler ancak bu örneklerden hiçbirinde yasal sınır değerinin aşılmadığını bildirmişlerdir (47).

Siddappa ve ark., Hindistan'ın Karnataka ve Tamil Nadu eyaletlerinde yaptıkları çalışmada HPLC yöntemini kullanarak 45 UHT süt örneği ile çalışmışlardır.

Bu örneklerin 29'unun (%64.4) AFM1 ile kontamine olduğunu ve kontamine örneklerin tamamında AFM1 miktarının Avrupa Birliği'nin belirlediği yasal toksin sınırı olan 50 ng/L yi geçtiğini bulmuşlardır. Ancak Hindistan' da sütlerdeki yasal toksin düzeyi 0.5 µg/L olduğundan, bu sütlerin sadece 10'unun (%22.2) yasal sınırın üzerinde AFM1 içerdiğini çalışmalarında belirtmişlerdir (48).

Fallah ve ark., İran'nın merkezinden topladıkları 109 UHT süt örneği ile yaptıkları çalışmada, AFM1 ile kontamine 68 UHT süt örneğinin (%62.3) 19'unda (%17,4) yasal sınırın aşıldığını gözlemlemişlerdir (49).

Kocasari ve ark., Burdur ilinde yaptıkları çalışma sonucunda kullandıkları 41 UHT süt örneğinin %73.2' sinde AFM1 varlığı tespit etmişler, bunların sadece %4.4 ünün Türk Gıda Kodeksi' ne göre yasal sınır olan 50 ng/L değerini aştığını bildirmişlerdir (32).

Mersin ilinde yapılan başka bir çalışmada Delialioğlu ve ark. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi yöntemini (HPLC) kullandıkları çalışmalarında 45 UHT süt örneğinin %73.3 ünde AFM1 varlığına rastlamışlar ve bu sütlerin %2.2 sinin Türk Gıda kodeksine göre yasal sınırı (5ng/L) aştığını saptamışlardır (50).

Türkiye'den Kabak ve ark.'nın yaptıkları bir diğer çalışmada HPLC yöntemini kullanarak 40 UHT süt örneğini incelemişler ve 8 UHT sütün (%20) AFM1 ile kontamine olduğunu ve 2'sinde (%5) yasal sınırın aşıldığını bildirmişlerdir (51).

Bursa'da farklı marketlerden toplanan 50 UHT süt örneğiyle çalışan Gündinç ve ark., kullandıkları örneklerin tamamının AFM1 ile kontamine olduğunu, ancak bu örneklerden sadece 10'unda (%20) yasal sınırın aşıldığını bulmuşlardır (52).

Türkiye'de yapılan farklı bir çalışmada Unusan, İç Anadolu Bölgesi'nin farklı illerinden 129 farklı UHT süt örneği kullanarak mevcut AFM1 düzeylerini belirlemiş ve kullandığı süt örneklerinin 75' inin (%58.1) AFM1 ile kontamine ve kontamine örneklerin ise 61'inde (%47) yasal sınırın aşıldığını bulmuştur (53).

Tekinşen ve ark., İstanbul, İzmir, Konya, Edirne ve Tekirdağ illerinden topladıkları 100 farklı UHT süt örneği ile bir çalışma yapmışlardır. Bu süt örneklerinin %67' sinin AFM1 ile kontamine olduğunu ve %31' inde yasal sınırın aşıldığını çalışmalarında bildirmişlerdir (54).

Bu çalışmada kullanılan 75 UHT süt örneğinin 69' unda (%92) farklı düzeylerde AFM1 varlığı saptanırken, bu süt örneklerinin 3'ünde (%4) yasal sınırın aşıldığı

(sırasıyla 88.2 ng/L, 55.0 ng/L ve 54.4 ng/L) belirlenmiş ve 6 (%8) örnekte toksine rastlanmamıştır.

Dünya genelinde AFM1 ile kontamine olan UHT süt örnekleriyle yapılan çalışma sonuçları, bu çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında, sadece Santos ve ark. tarafından Brezilya'da yapılan çalışmada belirlenen AFM1 kontaminasyon oranının bu çalışma oranlarından daha düşük olduğu, Martin ve ark. tarafından Portekiz' de yapılan çalışmayla sonuçlarımızın benzerlik gösterdiği, Zheng ve ark.'nın Çin'de, Siddappa ve ark.'nın Hindistan'da ve Fallah ve ark.'ın İran'da yapmış oldukları çalışmalarda ise AFM1 kontaminasyon oranlarının bu çalışmadan çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumda, özellikle Hindistan ve İran'da hayvan yemlerinin ve depo koşullarının iyileştirilmesi için belirli politikalar üretilmesi ve halk sağlığı açısından büyük risk taşıyan bu ürünlerin piyasaya sürülmeden önce mutlaka denetlenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Bu çalışma, Türkiye'de UHT süt örnekleriyle yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, Delialioğlu ve ark. tarafından Mersin'de yapılan çalışmadaki AFM1 kontaminasyon oranının bu çalışmadaki orandan daha düşük olduğu, Kabak ve ark.'nın Türkiye genelinde ve Kocasari ve ark.'nın Burdur'da yaptığı çalışma sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği, Gündinç'in Bursa'da, Unusan ve ark.'nın İç Anadolu Bölgesi'nde, Tekinşen ve ark.'nın Türkiye genelinde yapmış oldukları çalışmalardaki AFM1 kontaminasyon oranlarının bu çalışmadaki AFM1 düzeylerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Türkiye genelindeki bu farklılıklar sütlerin toplandığı mevsimlerin farklılıklarına ve coğrafik özelliklere bağlanmıştır. AFM1 düzeyinin yüksek bulunduğu bölgelerde ise sütlerin AFM1 içermemesi ve kaliteli süt ve süt ürünleri üretimi için depo koşulları iyileştirilmesi, AFB1 ile kontamine yemlerin hayvanlara verilmemesi, denetimlerin sık ve ciddi bir şekilde yapılmasının gerektiği düşünülmüştür.

UHT sütler ile yapılan çalışmaların yanı sıra pastörize günlük sütlerdeki AFM1 düzeylerini araştıran pek çok çalışma da yapılmıştır.

Bu amaçla, Atina'da yapılan bir çalışmada Markaki ve ark., çalışma için farklı marketlerden 81 adet pastörize süt örneği toplamışlardır. HPLC yöntemi kullanarak bu sütlerdeki AFM1 miktarlarını belirlenmiştir. Bu örneklerin 32'sinde AFM1 düzeyi 2.5-5 ng/L, 31' inde 0.5-1 ng/L olarak bulunurken, yasal sınırı geçen hiçbir örneğe rastlanmamış ve 9 örnekte ise AFM1 ile kontaminasyonun olmadığı bulunmuştur (55).

Tayland'da "Okul Sütleri Projesi" kapsamında yaz, sonbahar ve kış mevsimlerinde merkez bölgedeki 50 farklı okuldan 150 pastörize süt örneği toplayarak çalışma yapan Ruangwises ve ark., tüm süt örneklerinin AFM1 ile kontamine olduğunu fakat hiçbir örneğin yasal sınır olan 0.5 µg/L değerini geçmediğini ve sütlerde bulunan AFM1 miktarının kış aylarında en yüksek seviyede olduğunu bulmuşlardır (56).

Siddappa ve ark., Hindistan'nın Karnataka ve Tamil Nadu eyaletlerinde yaptıkları çalışmada HPLC yöntemini kullanarak 7 pastörize süt örneğinde AFM1 varlığını araştırmışlardır. Bu örneklerin 3'ünde (%42.9) AFM1 miktarının Avrupa Birliği'nin belirlediği yasal toksin sınırı olan 50 ng/L yi geçtiğini bulmuşlardır (48).

Fas'ta Zinedine ve ark., 54 pastörize süt örneği üzerinde çalışmışlardır. Bu örneklerin %88.8' inde AFM1 ile kontaminasyonu olduğunu ve %7.4'ünde yasal sınırın aşıldığını bildirmişlerdir (57).

Sefidgar ve ark., İran'nın Babol kentinde pastörize sütler ile yaptıkları çalışmada, kış aylarında (ocak, şubat, mart) her ay 24 pastörize süt örneği toplayarak, bu sütlerdeki AFM1 düzeylerini kontrol etmişlerdir. Bu çalışmada toplamda kullanılan 72 pastörize süt örneğinin tümünde AFM1 varlığı tespit edilmiş ve tespit edilen toksin miktarlarının tüm süt örneklerinde yasal sınırın üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu üç ayda elde ettikleri sonuçlara göre sütlerde rastladıkları AFM1 miktarları, Ocak ayında 227.85 ng/L, Şubat ayında 229.64 ng/L ve Mart ayında ise 233.1 ng/L olarak çok yüksek değerlerde bulunmuştur (58).

İran'nın kuzeydoğusunda yapılan başka bir çalışmada Sani ve ark., kullandıkları 42 pastörize süt örneğinin %97.6 sında AFM1 varlığına rastlarken, bunların sadece %1.6 sının yasal AFM1 düzeyini aştığını gözlemlemişlerdir (59).

Tajik ve ark., İran'ın Urmia şehrinde 2005-2006 yılları arasında farklı marketlerden topladıkları 72 pastörize süt örneğiyle yaptıkları çalışmanın sonucunda tüm süt örneklerinin AFM1 ile kontamine olduğunu ve bunların %6.25' inde yasal sınırın aşıldığını bildirmişlerdir (60).

Zanjani ve ark. tarafından İran'ın Fariman kentinde yapılan başka bir çalışmada temmuz, ağustos ve eylül aylarında her ay 15 pastörize süt örneği incelenerek AFM1 varlığının aylara göre dağılımı incelenmiştir. Kullandıkları süt örneklerinin %100 ünde AFM1 varlığı saptanırken, eylül ayında toplanan örneklerin %28.88 inde yasal düzeyin aşıldığını belirlemişlerdir (8).

İran'nın Sari şehrinde mevsimsel AFM1 düzeylerini araştıran Mohammadi ve ark., her mevsimde 19 pastörize süt örneği toplamışlar ve kullandıkları 76 süt örneğinin tamamında AFM1 varlığına rastlamışlardır. Kış aylarında toplanan 19 örneğin 8'inde, ilkbahar aylarında toplanan 19 süt örneğinin 15'inde, yaz aylarında toplanan 19 süt örneğinin 10'unda ve sonbahar aylarında toplanan 19 süt örneğinin 13'ünde yasal toksin sınırının aşıldığını belirlemişlerdir (61).

Fallah ve ark., İran'nın merkezinden topladıkları 116 pastörize süt örneği ile yaptıkları çalışmada AFM1 ile kontamine 83 pastörize süt örneğinin (%71.5) 31 inde (%26.7)yasal sınırın aşıldığını gözlemlemişlerdir (49).

Behfar ve ark., İran'ın Ahvaz kentinde 100 adet pastörize süt ile yaptıkları çalışmada, HPLC yöntemini kullanmışlar ve çalıştıkları tüm süt örneklerinde 0.45 ng/L ve 9.76 ng/L aralığında değişen AFM1 varlığına rastlamışlardır. Süt örneklerindeki ortalama AFM1 miktarını ise 2.7 ng/L olarak hesaplamışlardır (62).

Bu çalışmada kullanılan 75 pastörize günlük süt örneğinin tümünde farklı düzeylerde toksine rastlanırken, hiç bir örnekte toksin düzeyi yasal sınırı aşmamıştır.

İran'da yapılan çalışmaların tamamı ile bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında, İran'ın Babol kentinde Sefidgar ve ark, kuzeydoğu bölgesinde Sani ve ark., Urmia kentinde Tajij ve ark, Fariman kentinde Zanjani ve ark, Sari kentinde Muhommadi ve ark., merkez ilçelerde Fallah ve ark, Ahvaz kentinde Behvar ve ark.,'nın çalışmalarında kullandıkları pastörize süt örneklerinin büyük bir kısmında AFM1 düzeyinin yasal sınırı aştığı görülürken, bu çalışmada yasal sınırı geçen örnek bulunamamıştır. Bu durum İran'da hayvan yemlerinin büyük ölçüde AFB1 ile kontamine olduğunu ve depo koşullarının standartlara uymadığını göstermektedir. Bu durumun iyileştirilmesi için ulusal bir politika geliştirilmesi ve sağlıklı denetimlerin yapılması gereklidir. İnsan sağlığı açısından son derece önemli olan süt ve süt ürünlerinin, kontaminasyona sebep olan koşullar iyileştirilmediği sürece kullanıma girmemesinin sağlanması uygun görünmektedir..

Dünya genelinden, Atina'da Markaki ve ark. ve Tayland'da Ruanguises ve ark.'nın yaptıkları çalışmalar ile bu çalışmanın sonuçları benzerlik göstermiştir. Bu durum, Türkiye de dahil olmak üzere, her üç ülke için de pastörize sütlerde AFM1 düzeylerinin yasal sınırı aşmadığını ve bu sütlerde insan sağlığı açısından bir tehlike olmadığını göstermiştir. Ancak, denetim ve kontroller düzenli olarak yapıldığı sürece bu koşulların süreceği unutulmamalıdır.

Bu çalışma ile mevcut yasal toksin düzeyleri göz önüne alınarak sütlerde potansiyel bir risk olup olmadığı belirlenmiştir ve epidemiyolojik verilere katkı sağlanmıştır. Sütlerin AFM1 içermemesi ve kaliteli süt ve süt ürünleri üretimi için depo koşullarının iyileştirilmesi, AFB1 ile kontamine yemlerin hayvanlara verilmemesi ve yasal sınırlar göz önünde tutularak düzenli denetimlerin yapılması gerektiği vurgulanmıştır.



## KAYNAKLAR

1. Selvaraj JN, Wang Y, Zhou L, et al. Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: a review. *Food Addit Contam Part A.*; 2015;49 :1-13.
2. Tsiplakou E, Anagnostopoulos C, Liapis K, Haroutounian SA, Zervas G. Determination of mycotoxins in feedstuffs and ruminant's milk using an easy and simple LC-MS/MS multiresidue method. *Talanta.*; 2014;130:8-19.
3. Ali MAI, El Zubeir IEM, Fadel Elseed A. Aflatoxin M 1 in raw and imported powdered milk sold in Khartoum state, Sudan. *Food Addit Contam Part B.*;2014;7(3):208-212.
4. Chavarría G, Granados-Chinchilla F, Alfaro-Cascante M, Molina A. Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. *Food Addit Contam Part B, Surveill.*; 2015;3210:1-8.
5. Fan S, Li Q, Sun L, Du Y, Xia J, Zhang Y. Simultaneous determination of aflatoxin B 1 and M 1 in milk, fresh milk and milk powder by LC-MS/MS utilising online turbulent flow chromatography. *Food Addit Contam Part A.*; 2015;32(7):1175-1184.
6. Kamkar A, Yazdankhah S, Nafchi AM, Nejad ASM. Aflatoxin M1 in raw cow and buffalo milk in Shush city of Iran. *Food Addit Contam Part B, Surveill.*; 2014;7(1):21-24.
7. Yentur G, Er B. Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi . *Turk Hij Den Biyol Derg.*; 2012; 69(1): 41 - 52.
8. Riahi-Zanjani B, Balali-Mood M. Aflatoxin M1 contamination in commercial pasteurized milk from local markets in Fariman, Iran. *Mycotoxin Res.*; 2013;29(4):271-274.
9. Omar SS. Incidence of Aflatoxin M1 in Human and Animal Milk in Jordan. *J Toxicol Environ Heal Part A.*; 2012;75(22-23):1404-1409.
10. Montagna MT, Napoli C, De Giglio O, Iatta R, Barbuti G. Occurrence of aflatoxin M 1 in dairy products in Southern Italy. *Int J Mol Sci.*; 2008;9(12):2614-2621.

11. Kew MC. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis.*; 2013;22(3):305-310.
12. Türk Gıda Kodeksi - 2008/26 No'lu Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ.;2008.
13. Bash G, Rae ID. The structure and chemistry of aflatoxins. In Aflatoxin, ed. L. A. Goldblatt. *Academic Press*, New York,; 1969; pp. 55–75.
14. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical. Microbiology. Rev.*; 2003;16, 497–516.
15. Sargeant K, Sheridan A, O'Kelly J, Carnaghan RBA. Toxicity associated with certain samples of groundnut. *Nature.*;1961;192; 1095–1097.15. 45.
16. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.*; 2011;49(5):1790-1794.
17. Thirumala-Devi K, Mayo MA, Reddy G, Reddy D. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in Indian poultry feeds. *J. Food Prot.*; 2002; 65(8): 1338-1340, 18. 15.
18. Şanlı Y, Kaya S, Pirinççi İ, Yavuz H, Baydan E, Demet Ö, Bilgili A. *Veteriner Klinik Toksikoloji.*;1995; Medisan Yayınevi. Yayın No: 21. Ankara.
19. Lanyasunya TP, Wamae LW, Musa HH, Olowofeso O, Lokwaleput IK. The risk of mycotoxins contamination of dairy feed and milk on smallholder dairy farms in Kenya. *Pak. J.Nutr.*; 2005; 4, 162–169.
20. Throckmorton K, Isham NC, Ghannoum MA, Keller N. Mycology, İçinde: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th Edition;Washington Dc, ASM Press; 2015;2188-2196.
21. Steyn PS, Stander MA. Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin. İçinde: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, eds. *General and Applied Toxicology*. 2nd Edition. United Kingdom: Macmillan Reference Ltd; 1999;2145-76.
22. Van Egmond HP. Aflatoxin M<sub>1</sub> Occurrence. Toxicity, Regulation. İçinde: *Mycotoxins in Dairy Products*.Hp London, Elsevier; 1989;11-49.
23. Yiannikouris A, André G, Poughon L, Jouany J. Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with  $\beta$ -D-Glucans. *Biomacromolecules.*; 2006;7 (4), 1147–1155.

24. Betina V. *Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects*, Elsevier, ISBN 0-444-98885-8, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo.; 1989;pp. 437.
25. Diaz DE, Hagler WM Jr, Hopkins BA, Whitlow LW. Aflatoxin binders I: in vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia*; 2002;156(3):223-6.
26. Smith JE, Moss MO. *Mycotoxins: Formation, analysis and significance*. John Wiley and Sons, Chichester.; 1985;pp. 36-41.
27. Campone L, Piccinelli AL, Celano R, Pagano I, Russo M, Rastrelli L. Rapid and automated analysis of aflatoxin M1 in milk and dairy products by online solid phase extraction coupled to ultra-high-pressure-liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.*; 2016;1428:212-219.
28. Soo PC, Horng YT, Chen AT, et al. Validation of nanodiamond-extracted CFP-10 antigen as a biomarker in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex in broth culture media. *Tuberculosis.*; 2015;95(5):620-624.
29. Yarsan E, Özdemir M. Aflatoksinlerin insan ve hayvan sağlığı yönünden önemi ve aflatoksinlerin yıkımlanmasına yönelik uygulamalar. *A.Ü Vet. Fak. Derg.*; 1997; 1; 41–49.
30. Becker-Algeri TA, Castagnaro D, de Bortoli K, de Souza C, Drunkler DA, Badiale-Furlong E. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *J Food Sci.*; 2016;81(3):R544-R552.
31. Ismail A, Akhtar S, Levin RE, Ismail T, Riaz M, Amir M. Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. *Crit Rev Microbiol.*; 2016;42(3):418-427.
32. Sahindokuyucu Kocasari F. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and infant formula samples consumed in Burdur, Turkey. *Environ Monit Assess.*; 2014;186(10):6363-6368.
33. Pietri A, Fortunati P, Mulazzi A, Bertuzzi T. Enzyme-assisted extraction for the HPLC determination of aflatoxin M1 in cheese. *Food Chem.*; 2016;192:235-241.
34. Fallah A, Barani A, Nasiri Z. Aflatoxin M1 in raw milk in Qazvin Province, Iran: a seasonal study. *Food Addit Contam Part B.*; 2015;8(3):195-198.
35. Krogh P, Hald B, Pedersen EJ. Occurrence of Ochratoxin a and Citrinin in Cereals Associated With Mycotoxic Porcine Nephropathy. *Acta Pathol Microbiol*

- Scand Sect B Microbiol Immunol.*; 1973;81 B(6):689-695.
36. Abarca ML, Bragulat MR, Castella G, Cabanes FJ. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl Environ Microbiol.*; 1994;60(7):2650-2652.
  37. Fink-Gremmels J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit Contam Part A.*; 2008;25(2):172-180.
  38. Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H. *Risk Assessment of the Mycotoxin Zearalenone.*; 1987;Vol 7.
  39. Lee J, Her JY, Lee KG. Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food Chem.*; 2015;189:45-51.
  40. Rafiei H, Dehghan P, Pakshir K, Pour MC, Akbari M. The concentration of aflatoxin M1 in the mothers' milk in Khorrambid City, Fars, Iran. *Adv Biomed Res.*; 2014;3:152.
  41. Taherimaslak Z, Amoli-Diva M, Allahyary M, Pourghazi K. Magnetically assisted solid phase extraction using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles combined with enhanced spectrofluorimetric detection for aflatoxin M1 determination in milk samples. *Anal Chim Acta.*; 2014;842:63-69.
  42. Marekovic I, Boinjak Z, Jakopovic M, Boras Z, Jankovic M, Popovic-Grle S. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *Chemotherapy.*; 2016;61(4):167-170.
  43. Amoli-Diva M, Taherimaslak Z, Allahyari M, Pourghazi K, Manafi MH. Application of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with vortex-assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid-phase extraction for determination of aflatoxin M1 in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. *Talanta.*; 2015;134:98-104.
  44. Zheng N, Sun P, Wang JQ, Zhen YP, Han RW, Xu XM. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. *Food Control.*; 2013;29(1):198-201.
  45. Santos JS, França VR, Katto SSE. Aflatoxin M1 in pasteurized, UHT milk and milk powder commercialized in Londrina, Brazil and estimation of exposure. *Arch Latinoam Nutr.*; 2015;65(3):181-5

46. Martins ML, Martins MH. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food Addit Contam.*; 2000;17(10):871-4.
47. Santini A, Raiola A, Ferrantelli V, et al. Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). *Food Addit Contam Part B, Surveill.*; 2013;6(3):181-186.
48. Siddappa V, Nanjgowda DK, Viswanath P. Occurrence of aflatoxin M1 in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. *Food Chem Toxicol.*; 2012;50(11):4158-4162.
49. Fallah AA. Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food Chem Toxicol.*; 2010;48(3):988-991.
50. Delialioğlu N, Otağ F, Öcal ND, Aslan G, Emekdaş G. Mersin İlinde Çiğ Ve Market Sütlerinde Aflatoksin M 1 Düzeyinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.*; 2010;1:87-91.
51. Kabak B, Ozbey F. Aflatoxin M 1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. *Food Control.*; 2012;28(2):338-344.
52. Gündinç UFA. Detection of aflatoxin M1 concentrations in UHT milk consumed in Turkey markets by ELISA. *Pakistan journal of Biological Sciences*; 2009;12(8):653-656.
53. Unusan N. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food Chem Toxicol.*; 2006;44(11):1897-1900.
54. Tekinşen KK, Eken HS. Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food Chem Toxicol.*; 2008;46(10):3287-3289.
55. Markaki P, Melissari E. Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. *Food Addit Contam.*; 1997;14(5):451-456.
56. Ruangwises NR. Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurized milk of the School Milk Project in Thailand . *J Food Prot.* Aug; 2009;72(8):1761-3.
57. Zinedine A, González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Idrissi L, Mañes J. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *Int J Food Microbiol.*; 2007;114(1):25-29.
58. Sefidgar SAA, Mirzae M, Assmar M, Naddaf SR. Aflatoxin M1 in pasteurized milk in Babol City, Mazandaran Province, Iran. *Iran J Public Health.*;

- 2011;40(1):115-118.
59. Mohamadi Sani A, Khezri M, Moradnia H. Determination of Aflatoxin M1 in Milk by ELISA Technique in Mashad (Northeast of Iran). *ISRN Toxicol.*; 2012;1-4.
  60. Tajik H, Rohani SM, Moradi M. Detection of aflatoxin M1 in raw and commercial pasteurized milk in Urmia, Iran. *Pak J Biol Sci.* ; 2007;10(22):4103-7.
  61. Mohammadi H, Shokrzadeh M, Aliabadi Z, Riahi-Zanjani B. Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk samples in Sari, Mazandaran province, Iran. *Mycotoxin Res.*; 2016;32(2):85-87.
  62. Behfar A, Khorasgani ZN, Ziyaaddin Alemzadeh MG, Rezvan Ebrahimi NT. Determination of Aflatoxin M1 Levels in Produced Pasteurized Milk in Ahvaz City by Using HPLC, *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*; 2012;7(2):80-84