

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ARDAHAN YÖRESİNDEN TOPLANAN SÜT VE KAŞAR
PEYNİRLERİNDE AFLATOKSİN M₁ DÜZEYLERİNİN
MEVSİMLERE GÖRE ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Ertan DOĞAN
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Murat BAYEZİT

KARS-2012

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora programı çerçevesinde hazırlanmış olan “**Ardahan Yöresinden Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerinde Aflatoksin M₁ Düzeylerinin Mevsimlere Göre Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek OYBİRLİĞİ/ ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:24/05/2012

Adı ve Soyadı

Başkan: Prof.Dr.Ayhan FİLAZİ

Üye: Prof.Dr.Salih OTLU

Üye: Prof.Dr.Abdullah DOĞAN

Üye: Yrd.Doç.Dr.Murat BAYEZİT


Üye: Yrd.Doç.Dr.Ayşe KANICI

İmza

Ayhan Filazi
Salih Otlu
Abdullah Doğan
Murat Bayezit
Ayşe Kanici

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 29/05/2012 tarih ve 21/138 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Mehmet Çitil
Enstitü Müdürü
Prof.Dr. Mehmet ÇİTİL



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IV
TABLO DİZİNİ	VI
ŞEKİL DİZİNİ	VII
ÖNSÖZ	VIII
1.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Genel Bilgiler	4
1.2.1. Mikotoksinlerin Tarihçesi	4
1.2.2. Mantar Çoğalmasını ve Mikotoksin Sentezini Etkileyen Faktörler	5
1.2.2.1. Biyolojik Faktörler	6
1.2.2.2. Fiziksel Faktörler	6
1.2.2.3. Kimyasal Faktörler	7
1.2.3. Başlıca Önemli Mikotoksinler	8
1.2.4. Aflatoksinler	11
1.2.5. Aflatoksinleri Üreten Mantarlar, Toksin Çeşitleri, Özellikleri ve Kimyasal Yapıları	11
1.2.6. Aflatoksinlerin Toksikokinetiği	14
1.2.7. Gıda Maddelerinde Bulunan Aflatoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Yönünden Önemi	17
1.2.8. Aflatoksinlerin Maksimum Tolerans Limitleri	18
1.2.9. Aflatoksinlerin Analiz Metotları	21
1.2.9.1. Biyolojik Metotlar	25
1.2.9.2. Kromatografik Metotlar	27
1.2.9.3. İmmunokimyasal Metotlar	33

2. MATERYAL ve METOT	35
2.1. Materyal	35
2.1.1. Süt Numuneleri	35
2.1.2. Kaşar Peyniri Numuneleri	35
2.1.3. Aflatoksin M ₁ ELİSA Test Kiti	37
2.1.4. Sarflar	38
2.1.4.1. Kimyasal Maddeler ve Solventler	38
2.1.4.2. Diğer Malzemeler	38
2.1.5. Analizde Kullanılan Cihazlar	38
2.2. Metot	39
2.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	39
2.2.1.1. Aflatoksin M ₁ -Enzim Konjugat Solüsyonu	39
2.2.1.2. Fosfat Buffer Solüsyonu	39
2.2.1.3. Yıkama Solüsyonu	39
2.2.2. Süt Numunelerinin Analize Hazırlanması	39
2.2.3. Peynir Numunelerinin Analize Hazırlanması	40
2.2.4. Yöntemin Çalışma Prensibi	40
2.2.5. Analiz İşlemi	41
3. BULGULAR	44
3.1. Yaz Dönemi Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerine Ait Analiz Sonuçları	46
3.2. Sonbahar Dönemi Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerine Ait Analiz Sonuçları	43
3.3. Kış Dönemi Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerine Ait Analiz Sonuçları	49
3.4. İlkbahar Dönemi Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerine Ait Analiz Sonuçları	51
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	56

5. ÖZET	68
6. SUMMARY	69
7. KAYNAKLAR	70
8. ÖZGEÇMİŞ	85

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- AB** : Avrupa Birliği
- ABD** : Amerika Birleşik Devletleri
- AFB₁** : Aflatoksin B₁
- AFB₂** : Aflatoksin B₂
- AFM₁** : Aflatoksin M₁
- AFM₂** : Aflatoksin M₂
- °C** : Santigrat
- CPA** : Siklopiazonik Asit
- EMİT** : Enzim Aktivitesine Bağlı İmmunoteknik Yöntem
- ELİSA**: Enzim Bağlanmış İmmunoabsorbant Yöntemi
- EU** : Avrupa Birliği
- g** : Gram
- GC** : Gaz Kromatografisi
- GLC** : Gaz Sıvı Kromatografisi
- YBSK** : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)
- IARC** : Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu
- İTK** : İnce Tabaka Kromatografisi
- Kg** : Kilogram
- L** : Litre
- MS** : Mass Spektrofotometresi
- ml** : Mililitre
- NADPH**: Nikotinamid Adenin Dinikleotid Fosfat
- ng** : Nanogram
- nm** : Nanometre
- OTA** : Okratoksin A
- ppb** : Milyarda Kısım
- ppm** : Milyonda Kısım
- ppt** : Trilyonda Kısım
- Rf** : Alıkonma Faktörü

- TGK** : Türk Gıda Kodeksi
İTK : İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)
UHT : Ultra High Temperature
UV : Ultra Viole
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
WCRF: Dünya Kanser Araştırma Fonu
WHO : Dünya Sağlık Teşkilatı

TABLO DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. 1: Başlıca Mikotoksin Türleri, Oluştukları Ürünler ve Zehirlenme Belirtileri	10
Tablo 1. 2: Bazı Mikotoksinlerin Zararlı Etkileri	16
Tablo 1. 3: Türk Gıda Mevzuatında Aflatoksinlerin Kabul Edilebilir Değerleri	19
Tablo 1. 4: Dünyada Bazı Ülkelerde Aflatoksinlerin Kabul Edilen Üst Limitleri	20
Tablo 2. 1: Numunelerin Toplandığı Merkezler ve Tarihleri	36
Tablo 3. 1: Yaz Dönemi Sütlerinde Aflatoksin M ₁ Düzeyleri	44
Tablo 3. 2: Yaz Mevsimi Kaşar Peynirinde Aflatoksin M ₁ Düzeyleri	45
Tablo 3. 3: Yaz Mevsimine ait Süt ve Kaşar Peyniri Örneklerinde Aflatoksin M ₁ Miktarının Dağılımı	45
Tablo 3. 4: Sonbahar Dönemi Sütlerinde Aflatoksin M ₁ Düzeyleri	46
Tablo 3. 5: Sonbahar Dönemi Kaşar Peynirinde Aflatoksin M ₁ Düzeyleri	47
Tablo 3. 6: Sonbahar Mevsimine ait Süt Örneklerinde Aflatoksin M ₁ Miktarının Yüzde Olarak Dağılımları	48
Tablo 3. 7: Sonbahar Mevsimine ait Kaşar Peyniri Örneklerinde Aflatoksin M ₁ Miktarının Yüzde Olarak Dağılımları	48
Tablo 3. 8: Kış Dönemi Sütlerinde Aflatoksin M ₁ Düzeyleri	49
Tablo 3. 9: Kış Dönemi Kaşar Peynirinde Aflatoksin M ₁ Düzeyleri	50
Tablo 3. 10: Kış Mevsimine ait Süt Örneklerinde Aflatoksin M ₁ Miktarının Dağılımı	51
Tablo 3. 11: Kış Mevsimine ait Kaşar Peyniri Örneklerinde Aflatoksin M ₁ Miktarının AB Kriterlerine Göre Dağılımı	51
Tablo 3. 12: İlkbahar Dönemi Sütlerinde Aflatoksin M ₁ Düzeyleri	52
Tablo 3. 13: İlkbahar Dönemi Kaşar Peynirinde Aflatoksin M ₁ Düzeyleri	53
Tablo 3. 14: İlkbahar Mevsimine ait Süt Örneklerinde Aflatoksin M ₁ Miktarının Dağılımı	54
Tablo 3. 15: İlkbahar Mevsimine ait Kaşar Peyniri Örneklerinde Aflatoksin M ₁ Miktarının Göre Dağılımı	54
Tablo 3. 16 : AFM ₁ Tespit Edilen Süt ve Peynir Numune Sayıları Karşılaştırması	55

ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. 1: Aflatoksinlerin Yapısal Formülleri	13
Şekil 1. 2: Aflatoksin B ₁ ' in Metabolizma Yolları	15
Şekil 2. 1: Aflatoksin M ₁ Standart Eğrisi	43

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Ardahan il merkezi ile Çıldır, Hanak, Damal, Posof ve Göle İlçeleri'nden toplanan sığır sütü ve kaşar peynirinde Aflatoksin M₁'in mevsimlere göre düzeyleri araştırılmıştır. Ardahan ili Kuzeydoğu Anadolu bölgesinin önemli hayvancılık merkezlerinden biridir. Bölgedeki insanların başlıca geçim kaynağı hayvancılıktır. Önemli sayıda büyük ve küçükbaş hayvan bulunmaktadır. Besiciliğin yanı sıra büyük miktarlarda süt işletmeciliği de yapılmaktadır. Üretilen süt ve süt ürünlerinin bir kısmı yöre insanı tarafından tüketilirken, diğer önemli bir kısmı il dışına sevk edilmektedir. İl dışına gönderilen süt ürünlerinin başında peynir gelir. İlde çok sayıda peynir çeşidi üretilmektedir. Bu peynirler arasında hiç kuşkusuz kaşar peyniri önemli bir yere sahiptir. Ardahan yöresinde çok sayıda kaşar üreten süt işletmesi bulunmaktadır. Bu işletmeler değişik miktarlardaki sütü kaşar peyniri başta olmak üzere süt ürünlerine dönüştürmektedir. Süt işletmelerinin bir kısmı modern fabrikalar şeklinde hizmet vermektedir. İşletmelerin diğer bir kısmı ise geleneksel yöntemlerle çalışmakta ve giderek daha modern işletmeler haline dönüştüğü görülmektedir. Ayrıca aile işletmeleri süt ve süt ürünlerinin elde edilmesinde yörede önemli bir paya sahiptir. Üretilen süt ve ürünleri miktarı kesin veri olmamakla birlikte tonlarca olduğu söylenebilir.

Süt ve peynirin insan beslenmesinde önemli bir yeri vardır. Hem Ardahan'da hem de diğer illerde büyük miktarlarda ve sevilerek tüketilirler. Taşıyacağı ilaç ve zehir kaynaklı bulaşan ya da kalıntılar tüketicilerde akut veya kronik zehirlenmelere neden olabilir. Sonuçta tüketiciler değişik derecede sağlık ve ekonomik açıdan olumsuz yönde etkilenirler. Bu nedenle süt ve süt ürünlerinin diğer gıda maddeleri gibi doğal kirleticileri taşımaması sağlık açısından çok önemlidir. Doğal kirleticiler içerisinde ağır metaller, bitkisel zehirler ve mikotoksinler vb yer almaktadır. Bir mikotoksin olan aflatoksinlerin yörede üretilen süt ve süt ürünlerindeki düzeylerinin tespiti, sağlık açısından büyük önem arz etmektedir. Araştırmada Ardahan ilinde üretilen süt ve kaşar peynirlerinde Aflatoksin M₁ varlığı nitel ve nicel olarak ortaya konacaktır. Muhtemel bulunabilecek toksin miktarlarının insan sağlığı açısından risk oluşturup, oluşturmadığı tespit edilecektir. Durumun ortaya konmasının gerekli tedbirlerin alınmasına hizmet edeceği düşünülmektedir.

Bu tezin yürütülmesinde ve doktora çalışmasının planlanması, gerçekleştirilmesi aşamalarında her zaman bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım başta danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Murat BAYEZİT olmak üzere, KAÜ Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof.Dr. Abdullah DOĞAN, Doç.Dr.Dinç EŞSİZ, Doç.Dr Asım KART ve Yrd.Doç.Dr. Oktay ÖZKAN'a teşekkür ederim.

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsan ve hayvan sağlığının korunması günümüzün önemli sorunları arasındadır. Canlıların yaşam süresi ve sağlığı kalıtım başta olmak üzere bakım ve beslenme gibi çok sayıda çevre şartlarından etkilenmektedir. Sağlıklı bir yaşam sürmek için doğru, dengeli ve güvenli beslenme zorunludur. Beslenmede kullanılan maddeler canlıların sağlığını bozmayacak özelliklere sahip olmalıdır. Besinin çeşidi, tüketilen miktarı, tüketim şekli ve besleyici değeri kadar gıdaların sağlıklı olup olmadığı da büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde hayvancılık önemli ölçüde büyük ve modern işletmecilik şeklinde yapılmaktadır. Bir hayvancılık işletmesinin karlılığı ve devamı yöreye uygun ırk seçimi, yeterli ve dengeli besleme, hayvan hastalıkları ile mücadele gibi bir takım şartların yerine getirilmesine bağlıdır. Hayvancılık işletmelerinde yem olarak kullanılan besin maddelerine uygunsuz saklama ve işleme koşullarında zararlı ögeler bulaşarak besinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilmektedir. Mantar bakteri gibi bu zararlı unsurlar besinin bozulmasına sebebiyet vererek sadece ekonomik kayıplar doğurmakla kalmamakta aynı zamanda böyle besinleri tüketen insan ve hayvanlarda ciddi boyutlara varan besin zehirlenmelerine de neden olmaktadır.

Gıdalar tüketimine sunuluncaya kadar çeşitli nedenlere bağlı olarak bozulmaktadırlar. Bozulmaya neden olan etmenler arasında çevrede fazla bulunan ve normal çevre şartlarına karşı oldukça dayanıklı olan küf mantarları önemli bir yer tutmaktadır (11, 46). Yem ve gıda maddeleri tarlada yetiştirme, hasat, taşınma, işleme ve depolama anında küf mantarlarıyla kontamine olabilmektedir. Söz konusu mantarlar besin maddelerinde uygun koşullar bulduğunda üreyerek, sentezledikleri bir takım maddeleri buldukları ortama bırakmaktadırlar. Bu maddeler mantarların ekzojen toksinleridir. Mantarların böyle metabolitlerine mantar zehiri anlamına gelen mikotoksin (mantar, toksin) adı verilmektedir (11, 58, 142, 145). Mikotoksinler yem veya yem ham maddelerinde oluştuklarında hayvanlar tarafından sindirim sistemi ile

alınırlar. Mikotoksin içeren yemlerin canlılar tarafından tüketilmesi oluşan mikotoksinin çeşidine, miktarına ve canlının direncine bağlı olarak akut, subakut ya da kronik tipte zehirlenmelere neden olmaktadır. Bu tip zehirlenme olaylarına mikotoksikozis adı verilmektedir. Akut ve kronik zehirlenmelerde ölüm görülebilir. Hayvanlar tarafından besinlerle düşük dozlarda uzun süre alınan mikotoksinler canlı ağırlık artışında azalma, büyümede yavaşlama, zayıflama, et, süt ve yumurta veriminde düşme yaparak hayvancılık işletmelerinde önemli ekonomik zararlara neden olurlar. Mikotoksinler süt, yumurta veya et gibi hayvansal ürünlere geçebilir. Böyle ürünleri tüketen insanlarda kronik zehirlenmeler, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler görülebilir (49, 154). Ortaya çıkan etkiler doğal olarak mikotoksin çeşidiyle ilişkilidir.

Mikotoksin oluşturan mantarlar spor ve misel fragmentleri halinde gıda ve gıda ürünlerini kontamine ederler. Bu kontaminasyon ürünün tarlada yetiştirme ve olgunlaşması aşamasında olabileceği gibi hasat ve depolanma aşamalarında da olabilmektedir. Gıda ve gıda ürünlerine kontamine olan küfler, uygun koşullar bulduklarında hızla çoğalarak ürünlerin nitelik ve niceliğini değiştirip, bozulmasına neden olur. Böyle besinlerin fiziksel olarak görünümü bozulmuştur. Besinlerde üreyen mantarlar aynı zamanda tüketicilerde zehirlenmelere neden olabilecek mikotoksinleri de oluştururlar. Bu ürünleri tüketen insanların sağlığı kimyasal kirlilik sonucu olumsuz etkilenmektedir (135).

Mantarlar çevre koşullarına karşı çok dayanıklıdırlar. Aynı zamanda tek spordan dahi çabuk üreyebilmeleri ve düşük su seviyelerine uyum göstermeleri nedeniyle gıda ve gıda maddelerinde oldukça hızlı üreme yeteneğine sahiptirler. Üremiş oldukları gıda maddelerinde fiziksel ve kimyasal olarak istenmeyen etkilere yol açarak çok önemli ekonomik kayıplara da neden oldukları bilinmektedir (13).

Şimdiye kadar 110.000'den fazla mikromantar türü izole ve tanımlanarak özellikleri saptanmış olmasına rağmen, bunlar içerisinde 350 dolayında türün toksijenik özellikte olduğu ve 300 den fazla mikotoksin çeşidi sentezleyebildikleri belirlenmiştir (142). Bilinen bu toksijenik mantar türlerinin arasında *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerinin ürettiği mikotoksinlerin son derece toksik oldukları rapor edilmiştir. Bu tip mantarların ürettiği

mikotoksinlerle meydana gelen zehirlenme vakaları ülkelere ve bölgelere göre farklılık gösterdiği araştırmacılar tarafından gözlemlenmiştir (4, 105).

Mikotoksinlerin büyük bir çoğunluğu *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türü mantarlar tarafından salgılanmaktadır (109, 116). Bu mantar türleri dünyadaki çoğu gıda ve gıda maddelerini kontamine ederek insan ve hayvan sağlığı açısından büyük risk oluşturlar. Mantarların oluşturdukları bu toksik metabolitlere, yaygın olmaları nedeniyle günümüzde bazı bilim adamları tarafından “Doğanın Pestisitleri” de denilmektedir (39, 164).

Bu mikotoksin grupları içerisinde *Aspergillus* cinsi mantarların salgıladığı mikotoksinler, canlılara verdikleri zarar nedeniyle özel bir öneme sahiptirler. *A. flavus*, *A. parasiticus* ve diğer mantar türlerinin vejetatif ve spor formları insanlarda allerji, enfeksiyon ve zehirlenme olmak üzere üç farklı duruma sebep olabilmektedirler (67). *A. flavus* mantarının hem hasattan önce hem de hasattan sonra gıda ürünlerine bulaşması nedeniyle Güney Amerika’da ve dünyanın tamamına yakın ülkelerinde önemli bir tarımsal sorun oluşturmaktadır. Çok toksik bir mikotoksin olan Aflatoksinler, *A. flavus* adlı mantar tarafından sentezlenmektedir. Bu toksinlerle bulaşık gıda maddelerini tüketen insan ve hayvanlarda karsinojenik etkiye neden olmaktadır. Bu nedenle aflatoksikozis bütün dünyada üzerinde durulması gereken güncel bir sorun durumundadır (11).

Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerine zararlı etkilerinin ortaya konmasından sonra Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu 19 Haziran 1993 tarihinde Aflatoksin B₁’i birinci, Aflatoksin M₁’i ise ikinci sınıf karsinojen maddeler arasına almıştır (44). Bu nedenle insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan besinlerdeki miktarlarının tespiti büyük bir önem arz etmektedir. Bu konuyla ilgili sürekli çalışmalar ve mikotoksikozisten korunma yöntemleri hakkında tartışmalar yapılmaktadır. Bütün bu çalışmalar toplumu bilinçlendirmekle birlikte şimdilik dünyada gıdaların hepsinin mikotoksinsiz olarak elde edilmesinin çok zor olduğunu ortaya koymaktadır. Gıda maddelerinde mikotoksin düzeylerinin azaltılabileceğini (zararsız düzeylere indirilmesi) söylemek daha doğru bir düşüncedir.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Mikotoksinlerin Tarihçesi

Mikotoksinlerin tarihi oldukça eski yıllara dayanmaktadır. Mikotoksin zehirlenmelerinin kayıtlara geçen ilk örneğini, ergotizm oluşturmaktadır. Ortaçağda çavdar mahmuzuyla kirlenmiş unlardan hazırlanan ekmekleri yiyen insanlarda karıncalanma ve sinirsel belirtiler gözlenmiştir. Bu hastalık belirtileri ortaçağda “Aziz Antonius hastalığı” olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan 1890’lı yıllarda *Penicillium* cinsi mantarlarla kirlenmiş pirinçleri tüketen insanların sağlığının bozulduğu Japon patologlar tarafından ortaya konmuştur (15, 42, 125, 140, 141, 142). Küflü gıdaların tüketilmesinin hastalık oluşturduğunun anlaşılması, küf mantarlarının önemini ortaya koymuş ve üzerinde çok sayıda araştırmalar yapılmasına neden olmuştur.

İngiltere’ de 1960 yılında ortaya çıkan ve yaklaşık 100.000 kadar hindinin ölümüyle sonuçlanan nedeni bilinmeyen bir hastalık gözlenmiştir. Bilim adamları arasında oldukça şaşkınlık yaratan bu hastalığa nedeni bilinmediğinden “Hindilerin X hastalığı” (Turkey X Diseases) denilmiştir. Daha sonra mantarlar üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda *Aspergillus flavus* tarafından üretilen toksik bir madde olan aflatoksin tespit edilmiştir. Aflatoksinlerin tespiti, mikotoksinlerin öneminin anlaşılması açısından bir dönüm noktası olmuştur. Bu tarihe kadar (1960’lı yıllar) mantarların sadece besinlere küf olarak zarar verdikleri biliniyordu (fiziksel bozulma). Aflatoksinlerin bulunmasıyla toksik etkiye neden olan mantar metabolitlerinin önemi anlaşılmiş ve yaklaşık son 50 yıldır mikotoksikozis üzerinde yaygın olarak araştırmaların yapıldığı bir konu olmuştur (15, 16, 44, 125, 140, 141, 142, 147).

Türkiye aflatoksin sorunuyla ilk kez 1967 yılında Kanada’ ya ihraç ettiği 10 ton fındığın iade edilmesiyle karşılaşmıştır. Daha sonra 1971 ve 1973 yılında sırasıyla ABD’ ye ve Danimarka’ ya ihraç edilen gıda maddelerinde aflatoksin tespit edilip, iade edilmesiyle önemli bir ihracat sorunu doğmuştur (47). Bu durum mikotoksikozisin ekonomik açıdan önemli olduğunu anlamına da gelmektedir.

1.2.2. Mantar Çoğalmasını ve Mikotoksin Sentezini Etkileyen Faktörler

Morfolojik özelliklerine göre mantarlar kabaca mikromantarlar ve makromantarlar diye iki grup altında incelenmektedir. Mantarlar tek (mikromantarlar) veya çok hücreli (makromantarlar) canlılar olup, doğada geniş bir dağılım hacmine sahiptirler. Makromantar sporları ile mikromantarlar bir ortamdan diğer bir ortama havayla kolaylıkla taşınabilmektedir. Bu nedenle çok uzun mesafelere kadar giderek kontaminasyon sorunu doğurabilirler. Mantarların yayılmasını ve üremesini etkileyen ikinci faktör ise ortamın su oranıdır (142). Suyu çok sevdiklerinden nem oranına paralel bir dağılım gösterirler. Mikromantarların bir kısmı (*candida vb*) canlılar üzerinde üreyerek hastalık meydana getirirken, diğer bir kısmı gıda maddelerinde üreyerek bozulmaya neden olmakta ve toksin sentezlemektedirler.

Tarımsal ürünler ve insan beslenmesinde kullanılan gıda maddeleri daima mantarların hedefi durumundadır. Kontamine ettikleri gıda maddelerinde üreyerek toksin oluşturup zehirlenmelere sebep olmalarının yanında, fiziksel ve kimyasal bozumaya da neden olurlar. Gıda maddelerinde ortaya çıkan bu değişiklikler çok önemli ekonomik kayıplara yol açar (69). Canlılar üzerinde üreyip hastalık yapan *Tricophyton*, *Microsporium*, *Dermatophyton* ve *Candida* gibi mantar enfeksiyonlarından mikotoksikozis çok farklıdır. Mikotoksikoziste mantarların kendileri hastalık yapmayıp salgıladıkları metabolik ürünleri zehirlenmelere neden olmaktadır (70, 142). Diğer bir deyişle mikotoksikozis bir enfeksiyon değil bir zehirlenmedir.

Mantarlar üremek için karbon, azot, potasyum ve fosfor gibi temel ve makroelementlere ihtiyaç duymaktadır. Mantarların bir kısmı bitkiler üzerinde fitoparazit olarak yaşarlar. Bir kısım mantarlar ise ürünlerin işlenmesi ve depolanması aşamasında bulaşarak kirletici olarak rol oynarlar. Her mantar üremesi ve küf oluşumunun, toksin üretimi anlamına gelmeyeceği rapor edilmektedir. Bazı hayvansal ürünlerde (salam, sosis gibi) mantar ürediği halde toksin üretilmediği bildirilmektedir. Dolayısıyla toksin üretilmesinde önemli bir etken olarak besin çeşiti gösterilmektedir. (142, 155).

Mikotoksin üretilmesini etkileyen faktörler üç başlık altında sınıflandırılabilir. Bunlar biyolojik, fiziksel ve kimyasal faktörlerdir.

1.2.2.1. Biyolojik Faktörler

Mantarların üreyerek mikotoksin oluşturması için her şeyden önce biyolojik bir konakçıya gereksinim vardır. Biyolojik bir konakçı olmasa da ortamda mutlaka organik madde ve suyun bulunması şarttır. Mikotoksin üreten mantarların büyük bir çoğunluğu bitkilerde patojen olarak bulunmaktadır. *A. flavus*'un mısır bitkisinin köklerinde zararlı etkilere neden olduğu bilinmektedir. Kök hücreleri mantar tarafından parçalanmaktadır (29). Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında *F. graminearum* ve *F. moniliforme* başta olmak üzere çeşitli *Fusarium* cinsi mantarların enfeksiyonlara yol açtıkları bildirilmektedir (127). Mikotoksin üretimi ile enfeksiyon düzeyleri arasında bir ilişki gözlemlenmiştir. Mantar konsantrasyonunun artması toksin oluşumunu artırmaktadır. Brown ve ark. (25) mısır tohumlarında AFB₁ düzeyi ile *A. flavus*'un kolonizasyonu arasında bir korelasyonun olduğunu göstermişlerdir. Bitkinin türü mantar üremesini etkilemektedir. Tahıllar mantar kontaminasyonlarına karşı daha duyarlı bitki genotipleri arasında bulunmaktadır. Ilıman bölgelerde tahıllarda bulunan yüksek düzeyde Deoksinivalenol (DON), buğdayın baş kısımlarında yanıklara sebep olan *Fusarium* enfeksiyonunun şiddetini artırdığı bildirilmiştir. Sonuç olarak mikotoksin üretiminin bitki çeşidi ve diğer mantarların bulunup, bulunmamasından etkilenebildiği söylenebilir. (45, 90).

1.2.2.2. Fiziksel Faktörler

Gıda maddeleri tarlada, üretim ve depolama esnasında mantarlarla kontamine olabilirler. Kontamine olmuş mantarların toksin üretmesi çeşitli fiziksel faktörlerin etkisi altında değişkenlik göstermektedir. Bu faktörlerin arasında rutubet, ısı, oksijen oranı ve böcek hasarları bulunmaktadır (122). Ayrıca zaman ile mikotoksin üretimi arasında doğru bir orantı vardır.

Mantarlar aerobik canlılar olup yaşayabilmeleri için mutlaka oksijene ihtiyaç duyarlar (% 10-20). Mantarların üremesi ve toksin sentezi için gerekli olan çevre

koşulları arasında nem oranı ve ısı önemli bir yer tutmaktadır. Mantarlar mezofilik özellik gösterirler. Toksin sentezleyen mantarların çoğu 0-60 °C'de ürerler. Ancak üremeleri için en uygun ısı 22-32 °C arasında bulunur. Aflatoksin şekillendiren mantarlar 24-25 °C de ve % 15 ve üzerinde rutubet içeren hemen her çeşit yem ve besin maddesinde üreyerek mikotoksin sentezleyebilirler. Aflatoksinler normal ısı derecesine karşı oldukça dayanıklıdır. Parçalanabilmeleri için 300 °C'nin üzerinde ısıya ihtiyaç vardır ve dolayısıyla sütlerin pastörize edilmesiyle aflatoksin düzeyinde azalma görülmemektedir (17, 140, 142).

Araştırmalar göstermiştir ki, tarım ürünlerinin hızlı bir şekilde kurutulması mantarların gelişip, toksin üretebilmelerini baskılamaktadır. Rutubet oranının düşürülmesi toksin üretimini ve böceklerin zararlı etkilerini azaltmakta ve bitkilerin daha uzun süre bozulmadan kalmasına neden olmaktadır (82). Benzer şekilde *F. moniliforme* ile yapılan çalışmalarda zaman ve su miktarının mısırdaki *Fumonisin B₁* üretimi üzerinde olumlu etkiye neden olduğu görülmüştür. Hamitton (62) adlı araştırmacı hasat sonrası mısırın kurutulması rutubet içeriğinin % 15,5 ve daha aşağılara çekilmesinin fungal gelişmeyi olumsuz yönde etkilediği ve aflatoksin üretimini 24-48 saat içerisinde önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmiştir.

Mantar üretiminde bitkilerdeki hasar oranının da önemli olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu özellikle tropikal bölgelerde hasat ve depolama aşamasında insektlerin tohumlara verdiği zararlar mantar kontaminasyonu ve mikotoksin oluşumu açısından önemli bulunmuştur. Mevcut bilgiler ışığında böceklerin tahıllarda fungal enfeksiyonları kolaylaştırdığı ve mikotoksin oluşumu için hazırlayıcı bir faktör olduğu genel olarak söylenebilir (90).

1.2.2.3. Kimyasal Faktörler

Mikotoksin oluşumunu etkileyen kimyasal faktörlerin başında bitkilerde fungal hastalıkların kontrolü için oldukça yaygın kullanılan fungusitler gelmektedir. Günümüzde fungusitler mantar kontaminasyonu ve enfeksiyonlarının düşürülmesi amacıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu durum bulaşma riskini düşürücü bir faktör olarak ele alınabilir (10, 122). Fakat yapılan bazı araştırmalar fungusitlerin subletal dozlarda kullanılması mikotoksin üretimini artırabileceğini göstermiştir.

Badii ve Moss (10) 1988 yılında yaptıkları araştırmada fenpropimorph adlı fungusitin *A. parasiticus* tarafından salgılanan AFB₁ ve AFG₁ üretimini önemli ölçüde artırdığını rapor etmişlerdir (10).

Bitki ve ürünlerin pH derecelerinin mantar üremesini etkilemektedir. Mantarların üreyip toksin oluşturmaları için ihtiyaç duyulan pH aralığı oldukça geniş olup, bu değer 2-11 arasında değişmektedir. Çoğu mantarın üremesi için besinlerin optimum pH'sının 5-6 olduğu bildirilmektedir (133). Bu durum tüketilen besin maddeleri göz önüne alındığında çoğu besin maddesi mikotoksin oluşumu açısından büyük bir risk taşımaktadır. Mantarların karbonhidratlarda kolay ürediği bilinmektedir.

1.2.3. Başlıca Önemli Mikotoksinler

Mantarların gıda maddelerine bulaşıp, üremesiyle mikotoksinler sentezlenmektedir. Ancak her mantar mikotoksin sentezleyemeyebilir. Gıda ve gıda maddelerinde toksin sentezleyebilen mantarlar uygun koşullar bulduklarında üreyip toksik etki gösterebilen sekonder metabolitleri salgırlar. Sentezlenen mikotoksinlerden bir kısmının insan ve hayvanlarda mikotoksikozise neden olduğu bilinmektedir (142). Bu mikotoksinler, kuru saklama koşullarına oldukça dayanıklı olup aylarca hatta yıllarca zehirleyici özelliklerini koruyabilmektedirler. Mikotoksinler aynı zamanda ısıya karşı da oldukça dayanıklı olup buldukları gıdaların pişirilmesiyle parçalanamazlar. Bu açıdan ele alındıklarında insan sağlığı açısından daima büyük potansiyel bir risk oluşturmaktadırlar (30, 145, 152).

Mikotoksin oluşturma yeteneğine sahip küfler toprakta yaygın bulunurlar. Dünyanın bütün bölgelerinde bu mantarlara rastlanmaktadır. Mantarlar tarlada, taşınma, harmanlama ve depolama esnasında mantarların gelişmesi için uygun ısı ve rutubet olduğu takdirde hızla üreyerek tarım ürünleri ve bunlardan hazırlanan yem maddelerini kolayca istila edip kirletebilmektedirler (74, 158). Aşağıda Tablo 1'de *Aspergillus* ve *Penisilyum* türü mantarlar başta olmak üzere toksin üreten bazı mantarlar ve bunların oluşturduğu toksinler özetlenerek verilmiştir.

Süt ve süt ürünlerinde bulunan mikotoksinlerin başında Aflatoksin M₁ (AFM₁) ve M₂ (AFM₂) gelir. Ayrıca sütte Okratoksin A (OTA) ve siklopiazonik asit

(CPA) gibi mikotoksinler de bulunabilmektedir (113, 159). Mikotoksinlerin bir kısmı alındıktan sonra doğrudan sütle çıkarılabilirken diğer bir kısmı metabolitleri halinde sütle atılmaktadır.

Bilinen mikotoksinler içerisinde toksisitesi en fazla olanı Aflatoksin B₁ (AFB₁)'dir. Aflatoksin M₁ bu toksinin, AFM₂ ise AFB₂'nin sütle atılan metabolitleridir. Laktasyondaki hayvanların AFB₁ ve AFB₂ içeren yemlerle beslenmesi neticesinde vücuda alınan bu toksinler vucutta biyotransformasyona uğrayarak sütle geçen metabolitlere dönüşürler. Bu metabolitler sütle atılarak hem süt, hem de böyle sütlerden hazırlanan peynir, yoğurt, süt tozu ve tereyağı gibi süt ürünlerinde bulunurlar. Böyle ürünler insan sağlığı için ciddi risk oluşturur. AFM₁ sütte en fazla bulunan ve toksisitesi en yüksek olan bir mikotoksindir. Aflatoksin B₁ yemle alındıktan sonra AFM₁ metaboliti 6-24 saat içinde sütte tespit edilmekte, 12-48 saat içinde ise sütteki en yüksek düzeyine ulaşmaktadır. Yemle AFB₁ alımı kesildikten 72-96 saat sonra sütteki miktarı giderek azalmaktadır. AFB₁'in metaboliti olan AFM₁ sütle % 0,8-2,2 oranında atılmaktadır. Ancak bu oran kesin olmayıp hayvana, laktasyon periyoduna ve süt verimine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Sütte bulunan Aflatoksin M₁'in süt ürünlerindeki miktarı ürünlere göre değişiklik göstermektedir. Örneğin; süte göre peynirde yaklaşık % 40-60, kremada % 10 ve yağda % 2'den daha az oranda bulunmaktadır (155, 164). Bu toksin sütle uygulanan UHT, pastörizasyon gibi ısı işlemlerine karşı oldukça dayanıklıdır, parçalanmaz ve süt ürünlerine geçer. Bu nedenle aflatoksinlerin zararlı etkilerinden (karsinojen, immunotoksik v.b.) korunmak için süt ve süt ürünlerinde tolerans düzeyleri belirlenmiştir. Avrupa Birliği Ülkeleri ve Türkiye'de AFM₁ için belirlenen tolerans düzeyi 50 ng/kg süttür (0,05 ppb, Codex Alimentarius' a göre). Amerika Birleşik Devletlerinde ise bu limit 500 ng/kg süt (0,5 ppb) olarak tespit edilmiştir (36, 151).

Tablo 1. 1: Başlıca Mikotoksin Türleri, Oluştukları Ürünler ve Zehirlenme Belirtileri (163).

Mikotoksin türü	Üretildiği mantar	Oluştukları ürünler	Zehirlenme belirtileri
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
Okratoksin	<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>Stachybotris 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. graminearim</i>	Mısır, arpa ve diğer ürünler	Hiper östrojenik etkiler
Sporidesminler	<i>Pithomyces</i>	Meralarda	Hayvanlarda ekzama ile karakterize bozukluklar

1.2.4. Aflatoksinler

1.2.5. Aflatoksinleri Üreten Mantarlar, Toksin Çeşitleri, Özellikleri ve Kimyasal Yapıları

Aflatoksinler; *A. flavus*, *A. parasiticus* ve çeşitli toksijenik *Aspergillus* ile bazı *Penicillium* ve *Rhizopus* türleri tarafından üretilen mikotoksinlerdir (26, 84, 149). Aflatoksinler suda çok az, buna karşın kloroform ve metanol gibi diğer birçok organik maddelerde iyi çözünen bileşiklerdir. Aflatoksinler gıda ve yem maddelerinde oldukça stabildirler. Isıya karşı dayanıklıdırlar. Ancak çok düşük ve yüksek pH'larda (3'den az ve 10'dan büyük) kolay parçalanırlar. Yine okside edici ajanlarla temas ettiklerinde ve oksijenli ortamda UV ışığına maruz bırakıldıklarında hızla aktivitelerini yitirirler (56).

Aflatoksinler kimyasal yapılarına göre difurokumarosiklopentenon ve difurokumarolakton grubunda bulunan toksinlerdir (17). Aflatoksinlerin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ olmak üzere altı ana bileşiği vardır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde uzun dalga boyuna sahip (366 nm) UV ışığı altında Aflatoksin B₁ ve B₂ nin mavi, Aflatoksin G₁ ve G₂'nin ise yeşil floresans vermesine göre yapılmıştır (27, 56). B grubu toksinler kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, G toksinleri ise bu yapıda ek bir lakton halkası daha taşımaktadır (15, 103). Ayrıca bu toksin türevlerine ilaveten gerek küfden gerekse hayvan vücudundan elde edilmiş metabolitleri ile (B_{2a}, G_{2a}, P₁, Q₁ ve aflatoksikol gibi) aflatoksinlerin sayısı 17'ye ulaşmaktadır.

Yem ve besinlerde en fazla bulunanı ve en zehirli olanı AFB₁ dir. Bunu sırasıyla AFG₁, AFB₂ ve AFG₂ izler (15, 16, 17, 111, 114, 118). AFM₁ ve AFM₂ sırasıyla AFB₁ ve AFB₂'nin sütle çıkarılan metabolitleri olduğu tespit edilmiştir (72). Laktasyon periyodundaki hayvanlar Aflatoksin B₁ içeren yem maddelerini tükettiklerinde 12 saat içerisinde sütleriyle Aflatoksin M₁ çıkardıkları gözlenmiştir. Sütte bu toksinin miktarı birkaç gün sonra yüksek düzeye ulaştığı ve Aflatoksin B₁ alınımının kesilmesinden 72 saat sonra ise sütte belirlenemeyecek kadar azaldığı görülmüştür (54). Alınan Aflatoksin B₁'in yaklaşık % 1-3 kadarı Aflatoksin M₁ şeklinde sütle atıldığı tahmin edilmektedir (14). Karakaya ve Atasever (73), Erzurum

İli Pasinler ilçe merkezi ve köylerinde mısır silajlarında Aflatoksin B₁ ve bunu tüketen hayvanların sütlerinin Aflatoksin M₁ içeriği ile çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada Aflatoksin B₁'in yaklaşık % 1,07'sinin süte Aflatoksin M₁ olarak geçtiğini saptamışlardır. Bu geçiş oranını Pittet (112) adlı araştırmacı % 6'dan daha fazla olabileceğini belirtmektedir. Diğer taraftan bu geçiş oranlarının hayvana, güne ve hatta bir sağımdan diğer bir sağım arasına göre bile değişebileceği belirtilmektedir (88).

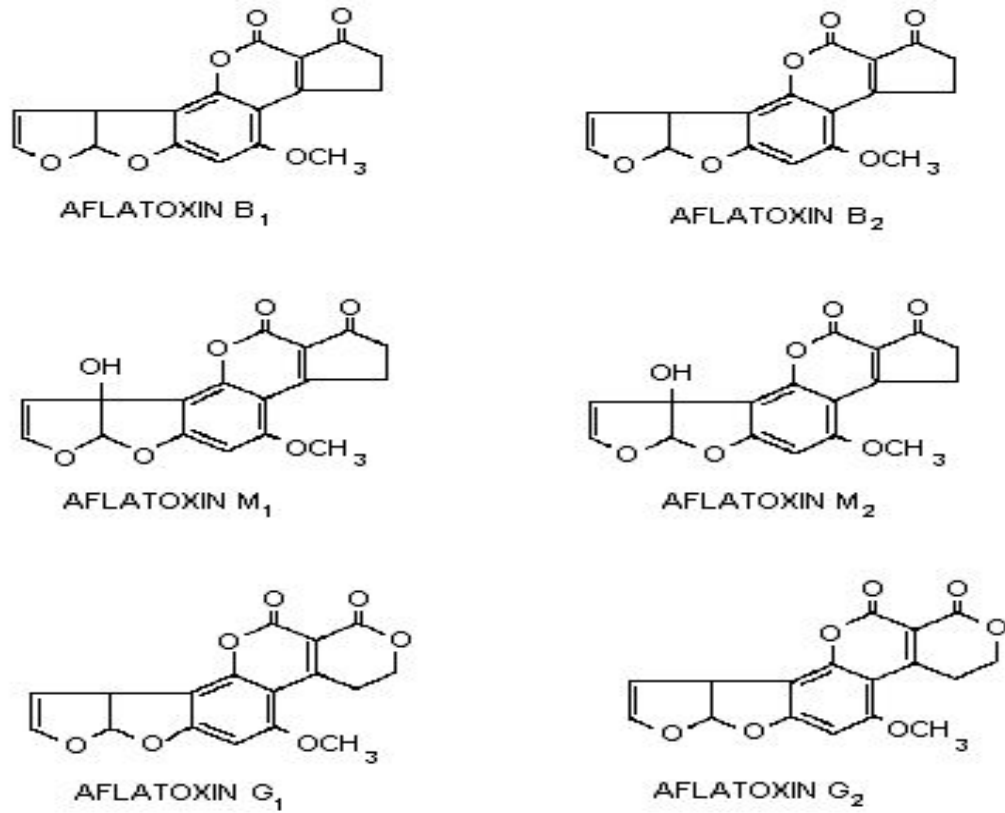
Süt ve süt ürünleri bütün ülkelerde insanlar için özellikle de çocuklar için kullanılan önemli bir besin kaynağıdır. Aflatoksin M₁ pastörizasyon işlemlerine karşı oldukça dayanıklı olup rutin dezenfeksiyon işlemlerinden etkilenmemektedir. Süt ve süt ürünleri Aflatoksin M₁ kalıntısı içerebileceğinden insan sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu yüzden pek çok ülke süt ve süt ürünlerinde Aflatoksin M₁ düzeylerini sürekli kontrol etmektedir. Yasal limitten fazla toksin taşıyan süt ve süt ürünlerinin tüketilmesine izin verilmemektedir. Bu durum zehirlenme riskini önemli ölçüde düşürmektedir (9, 117). Bu toksinin sütteki tolerans limiti ülkeden ülkeye değişkenlik gösterebilmektedir. Pek çok ülke tarafından toksinin tolerans sınırları belirlenerek sıkı kontrol uygulamalarına rağmen yine de önemli ölçüde Aflatoksin içeren sütlere rastlanılmaktadır (54).

Aspergillus flavus kültürleri ile kontamine olmuş gıda ve gıda maddelerinde meydana gelen zehirlenmeden Aflatoksin B₁ ve daha az da Aflatoksin G₁ sorumludur. Bu durum her iki toksinin etkileri terminal furan halkasının 8,9 karbon pozisyonunda bir doymamış bağa sahip olmalarıyla ilişkilendirilmektedir. Aflatoksin B₂ B₁'in, Aflatoksin G₂ de G₁'in dihidro türevleridir ve *in vivo* koşullarda B₁ ve G₁'e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktifler (81, 124).

Aflatoksinler akut ve kronik zehirlenmelere neden olan bileşiklerdir. İmmünotoksisiteye, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkilere neden olurlar. Bu bileşiklerin toksisitelerinin ve karsinojenik etkilerinin görüldüğü organların başında doğal olarak karaciğer gelir. Çünkü diğer organlara göre karaciğer metabolizmada büyük görev üstlenmektedir. Aflatoksin B₁ yem ile alındığında karaciğer toksini metabolize ederek sitotoksik ve genotoksik etkili bir metabolit olan Aflatoksin M₁'e ve diğer metabolitlere dönüştürür. Bu nedenle laktasyondaki sığır, koyun ve keçi gibi hayvanların aflatoksinleri alması insanlara zehirin yansıması açısından ayrıca bir

önem arz etmektedir. Aflatoksin M₁ Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) tarafından 1993 yılında insanlar için muhtemel kanser yapan ajanlar sınıfına dahil edilmiştir (101, 149).

Aflatoksinlerin karaciğer, böbrek ve üreme sistemi dâhil birçok organ ve dokularda patolojik değişiklikler yaptığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bağışıklık sistemi zayıflamaktadır (81, 124). Aflatoksikozis iki farklı şekilde ortaya çıkmaktadır. Bunların birincisi yüksek toksin alımına bağlı olarak ortaya çıkan ve özellikle civcivlerde yüksek ölüm oranıyla seyreden akut zehirlenmedir. İkinci zehirlenme şekli ise daha yavaş seyreden, zayıf derecede ve ilerleyen tarzda karaciğer hasarı ve klinik belirtiler ile kendini gösteren kronik zehirlenmedir. Bu zehirlenme şeklinde düşük miktardaki toksinin uzun süre alınması söz konusudur. Daha sık görülen bu zehirlenme karaciğer kanserine ve bağışıklık sisteminin bozulmasına sebep olmaktadır. Aflatoksinlerle meydana gelen subakut ve subkronik zehirlenmelere de rastlanabilmektedir (161).



Şekil 1. 1: Aflatoksinlerin Yapısal Formülleri (79)

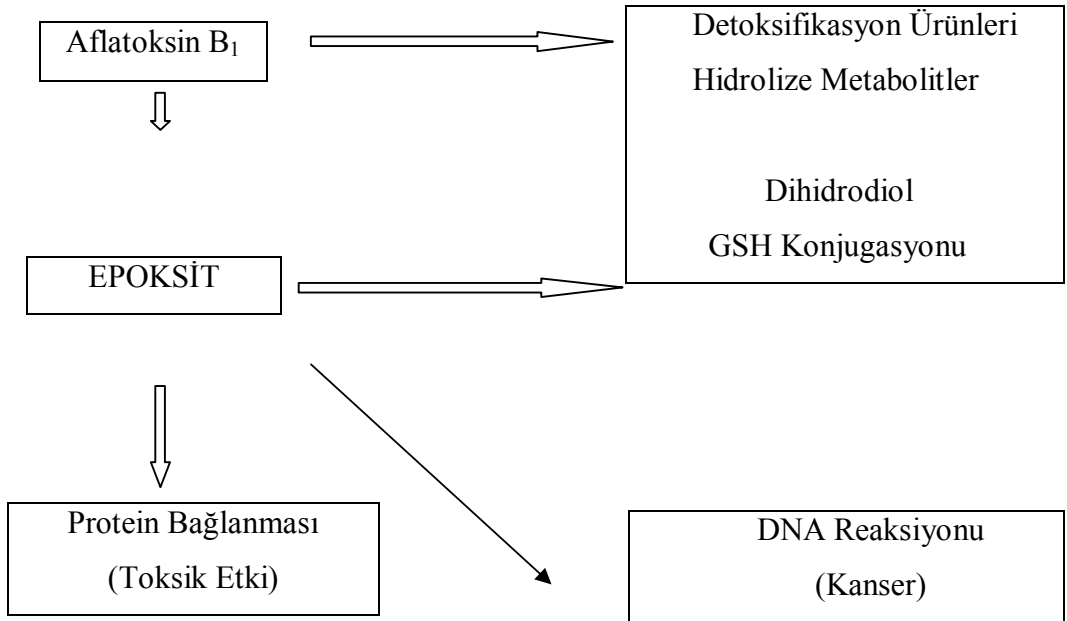
1.2.6. Aflatoksinlerin Toksikokinetiği

Aflatoksinlerle kirlenmiş yem ve yem hammaddelerinin yenilmesi ile sindirim sistemine alınan toksinler hızlı ve yüksek bir oranda emilirler. Dolaşıma geçen toksinler kan yoluyla bütün vücuda dağılır. Plazmadan, başta karaciğer olmak üzere doku ve organlara geçerek etkilerini gösterir (35, 91, 130). Aflatoksinlerin kendileri doğrudan etkili değildirler. Aflatoksin B₁'in karsinojenik ve mutajenik etkilerinin organizmada geçirdiği biyotransformasyon sonucunda ortaya çıktığı bildirilmektedir. Metabolizmaya uğradıkları organlar arasında karaciğer başta olmak üzere böbrek, akciğer ve diğer organlar sayılabilir. Aflatoksinler sitoplazmada öncelikle mikrozomal oksijenaz enzim sistemi ile biyotransforme edilmektedirler. Karaciğer ve diğer dokulara yerleşmiş sitokrom P-450 enzimleri oksitlenmesinde görev alır. Bu enzimler hücrelerin düz endoplazmik retikulumlarına yerleşmiş olup, demir taşıyıcı ve karbonmonoksitle kompleksi 450 nm dalga boyunda maksimum absorban vermektir. Sitokrom P-450'ler enzim olup, oksijene ve NADPH'a bağlı olarak çalışırlar. Aflatoksinlerin metabolizmaları mikrozomal oksidazlar ve diğer bir kaç enzimin katıldığı reaksiyonlar ile gerçekleşir. Bu enzimler Aflatoksin B₁'in oksidatif olarak metabolizmasını katalize ederek, yüksek reaktif özelliğe sahip olan aflatoksinin epoksit türevinin oluşmasına neden olurlar (152). Metabolizma sonucunda aflatoksin B₁-8,9-epoksit, aflatoksikol, aflatoksikol Q₁, aflatoksin P₁ ve aflatoksin M₁ gibi bir takım metabolitler meydana gelir. Bu toksinler karaciğerde DNA, endoplazmik retikulum ve enzimler gibi diğer makromoleküllere bağlanırlar (132).

Aflatoksin B₁ karsinojen ve dokular üzerine olan toksik etkilerini protein ve DNA gibi hücresel nükleofillerle reaksiyona giren AFB₁-8,9-epoksit metaboliti aracılığı ile gerçekleştirdiği rapor edilmektedir. Karaciğerde mikrozomal enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan epoksit türevleri özellikle çok zehirlidir. Metabolizmada görev alan sitokrom P-450 izoenzimleri arasında 1A2 ve 3A4 bulunmaktadır (25, 157). Toksik ve kanserojenik etkilerden sorumlu olan bu epoksit türevleri karaciğer ve diğer organ hücrelerini moleküler düzeyde etkilerler. Bu metabolitler DNA ve RNA sentezini engelleyerek protein sentezini bozarlar. Epoksit türevi DNA'ya bağlanır, RNA'nın sentezini engeller. Bunun sonucunda

DNA'ya bağlı RNA sentezi ile proteinlerin enzimatik olarak oluşunu bloke olur (21, 59, 115, 136, 139, 158, 160). Metabolizma sonucunda dokularda şekillenen reaktif metabolitler, DNA'ya geri dđnüşümü mümkün olmayan şekilde bağlanır. Bu durum genetik yapının hasar görmesine neden olur. Eğer hasara uğrayan DNA molekülü tamir edilemez ve hasar sabit kalır ise mutasyon ortaya çıkar. Bu durum yeni nesil hücrelere aktarılır. Organizmada mutasyonu onaran bir takım mekanizmalar bulunmaktadır. Eğer bunlar mutasyon onarımını gerçekleştiremez ise durum ilerleyerek anormal şekilde üreyen hücreler kanser gibi ciddi biyolojik hasarlara neden olabilir (25, 157).

Aflatoksinler plasenta engelini geçebilmektedir. Yemler aracılığıyla gebe hayvanlara verilen aflatoksinler, plasentayı açarak fđtusa ulaşmaktadır. Fđtusa geçen AFB₁ fđtusun karaciğerinde sitokrom P-450 enzim sistemleriyle metabolize olarak AFB₁-8,9-epoksite dđnüşebilmektedir (160). Aflatoksin B₁'in canlı organizmada uğradığı biyotransformasyon şekil 1. 2'de özetlenerek verilmiştir.



şekil 1. 2: Aflatoksin B₁' in Metabolizma Yolları (161)

Tablo 1. 2: Bazı Mikotoksinler ve Zararlı Etkileri (90).

Mikotoksinler	Zararlı Etkileri
Aflatoksin B ₁	Akut Toksikite: LD ₅₀ değerleri, 1.0-17.9 mg/Kg CA (Labaratuvar Hayvanları), 0.5 mg/Kg CA (Ördek); karaciğer lezyonları, teratojenite, ruminantlarda yemden yararlanma, bağışıklık sistemi ve üreme performansında düşüş, insanlar için karsinojen etki
Aflatoksin M ₁	Hepatotoksik ve karsinojenik
Deooksinivalenol	Domuzlar için güçlü bir gıda alımı engelleyicisi, teratojenik, ruminantlar daha dirençli
Diasetoksisirpenol ve T-2 toksin	Ruminantlarda değişik mikotoksikosis vakaları
Zearalenon	Sığırlarda infertilite, süt veriminde azalma ve hiperöstrojenizm
Fumonisinler	Sığır ve domuzlarda karaciğer lezyonları, equine leukoencephalomalasia, domuzlarda akciğer ödemi, İnsanlarda özefagus kanseri
Ergopeptine alkaloidleri	Ruminantlarda üreme performansı ve süt veriminde düşüş, büyümede yavaşlama, ısıya karşı duyarlılıkta artış
Lolitremler	Nörolojik etkiler: koordinasyon bozukluğu, şaşkınlık, baş dönmesi ve ruminantlarda çökme
Fomopsinler	Lupinosis: kötü his, karaciğer hasarı, sarılık, ışığa karşı duyarlılık ve koyunlarda ölüm
Sporidesminler	Koyunlarda yüzde ekzema, karaciğer hasarı, üriner lezyonlar ve ışığa karşı duyarlılık

LD₅₀: Median letal doz, CA: Canlı ağırlık

Yukarıda Tablo 1. 2’de önemli mikotoksinler ve bunların zararlı etkileri özetlenerek verilmiştir. Tablodan da anlaşılacağı gibi aflatoksinler insan ve hayvanlarda başta karaciğer kanseri olmak üzere ciddi zararlı etkilere neden olmaktadır.

1.2.7. Gıda Maddelerinde Bulunan Aflatoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Yönünden Önemi

Gıda maddelerinde bulunan mantarlar, ürünlerin bozulmasına neden olmakla kalmayıp, sentezledikleri toksinler aracılığıyla bu ürünlerle beslenen insan ve hayvanlarda önemli zehirlenmelere de neden olurlar. İnsan ve hayvanlarda görülen aflatoksinlere bağlı zehirlenmelere aflatoksikozis adı verilmektedir (35, 42, 142). Aflatoksinlerle meydana gelen zehirlenmeler zehirin dozu ve alınma süresine bağlı olarak akut ya da kronik olabilmektedir. Toksinin başlıca hedef organı karaciğerdir. Toksin karaciğer hücrelerinde lipit infiltrasyonuna neden olur. Bunu bir süre sonra nekroz izler. Aflatoksinler hücre proteinlerinin hem sentezi hem de yapısını bozarlar. Yaptığı olumsuz etkiler sonucunda karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması inhibe olur. Karaciğer tarafından sentezlenen ve vücut için gerekli olan serum proteinlerinde azalma görülür. Karaciğer ve direkt kan üzerine olumsuz etkileri sonucu ikterus ortaya çıkabilir. Aflatoksin zehirlenmelerinin diğer belirtileri arasında iştah azalması, ağırlık kaybı, nörolojik bozukluklar, ekstremitelerde ödem, karın ağrısı ve kusma sayılabilir. Ayrıca vücut boşluklarında sıvı birikimi ile böbrek ve bağırsaklarda kanamalar da gözlenebilmektedir (27, 35). Çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda akut aflatoksin zehirlenmesinin solunum (36, 87, 108), dolaşım (23, 64, 100) ve sindirim sistemi üzerine (28, 38) önemli zararlı etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Sığırlarda akut AFB₁ zehirlenmesinin alınan doza bağımlı olarak rumen hareketlerinin kasılma gücü ve sıklığını değiştirdiği de bildirilmektedir (37).

Aflatoksinlerle insanlarda meydana gelen en önemli akut zehirlenme 1974 yılında kuzeybatı Hindistan'da görülmüştür. Bu zehirlenme vakasında 6250-15600 mg/kg arasında değişen aflatoksin içeren mısır unlarının tüketilmesi sonucunda ciddi ölümler olduğu rapor edilmiştir (57, 89, 120, 137).

Aflatoksinlerin düşük miktarlarda uzun süreyle alınması sonucunda hayvanlarda kronik zehirlenmeler ortaya çıkmaktadır. Kronik zehirlenmeler düşük toksin konsantrasyonlarıyla ilişkili olduğundan kanatlılar başta olmak üzere bütün hayvanlarda çok daha fazla önem arz etmektedir. Kronik zehirlenmede bilinen en önemli belirti karaciğer kanseridir. Diğer belirtiler ise büyüme oranında yavaşlama,

zayıflık, süt ve yumurta üretiminde azalmadır. Bu tip zehirlenmede ayrıca bağışıklık sistemi de baskılanmaktadır. Bu etkileri makrofaj ve T hücrelerinin fagositik etkinliğinin azalmasına ve karaciğer başta olmak üzere diğer immun sistemde görev alan organların zarar görmesine bağlanmıştır. K vitamin düzeyini düşürmelerinin de bu etkilerde önemli bir rolü vardır. Bağışıklık sisteminin baskılanması sonucunda organizma bakteri, virüs ve mantar enfeksiyonlarına karşı duyarlı hale gelmektedir (42, 57, 89, 120, 137). Yapılan araştırmalar sonucunda uzun süre aflatoksinlere maruz kalan çiftlik ve laboratuvar hayvanlarında bağışıklık sisteminin bozulduğu ve karaciğer kanserinin ortaya çıktığı bildirilmektedir. Aflatoksinlerin benzer kronik etkilerine insanlarda da rastlanılmıştır. Dünya genelinde yapılan çalışmalar, gelişmekte olan ülkelerde yaklaşık 4,5 milyon insanın değişik derecede kronik aflatoksikozise maruz kaldıklarını göstermektedir (161). Kronik alflatoksikozis daha çok kırsal ve tropikal bölgelerde yaşayan ve yeterince beslenemeyen insanlarda görülmektedir. Kronik zehirlenmelerde mortalitenin % 10'dan % 60'lara kadar çıkabileceği rapor edilmiştir (32, 110, 144). Çünkü aflatoksinlerin hayvan deneyleriyle ortaya konmuş farklı organlarda genellikle spesifik olmayan çok sayıda etkileri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalardan kronik aflatoksin zehirlenmesinin insan sağlığı açısından çok önemli olduğu sonucu çıkarılabilir (16, 35, 86).

1.2.8. Aflatoksinlerin Maksimum Tolerans Limitleri

Mikotoksinlerin zehirleyici etkilerinin ve kaynaklarının anlaşılmış olması nedeniyle insan ve hayvan besinlerinde bulunabilecek düzeyleri ile ilgili Türkiye ve diğer ülkelerde bir takım yasal sınırlar getirilmiştir (Tablo 1. 3 ve Tablo 1. 4). Bu sınırlara uyulması insan sağlığının korunması açısından önemlidir. Ayrıca ekonomik kayıpları da engelleyecektir. Avrupa Birliği'ne üye olan ülkelerde ve Türkiye'de aflatoksin B₁'in yemlerde bulunabilecek üst sınırı 20 ppb, süt sığırlarının beslenmesinde kullanılan yem maddelerinde ise bu sınır değer 5 ppb olarak belirlenmiştir. Sütte bulunmasına izin verilen Aflatoksin M₁ miktarı ise 0,05 ppb olarak tespit edilmiştir. Bu durum 26.7.2010 tarih ve 27653 sayılı Yemde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğde bildirilmiştir.

Tablo 1. 3: Türk Gıda Mevzuatında Aflatoksinlerin Kabul Edilebilir Değerleri (29.12.2011 tarih ve 28157 sayılı remi gazetede yayımlanan gıdalardaki bulaşanların maksimum limitleri yönetmeliğinden özetlenerek)

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)		
	B₁	B₁+B₂+G₁+G₂	M₁
2.1. AFLATOKSİN			
2.1.1. Yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) - Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç	8,0	15,0	-
2.1.2. Badem, antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce çeşitli işlemlere tabi tutulacak olan)	12,0	15,0	-
2.1.3. Fındık ve brezilya fıstığı (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) - Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	8,0	15,0	-
2.1.4. Sert kabuklu meyveler (bazıları hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	-
2.1.5. Yer fıstığı diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) - Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç	5,0	10,0	-
2.1.6. Badem, antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulan ve gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	-
2.1.7. Tahıllar, bunlardan elde edilmiş ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri	2,0	4,0	-
2.1.8. Mısır ve pirinç (işleme tabi tutulacak), baharatlar	5,0	10,0	-
2.1.9. Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,050
2.1.10. Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	-	-
2.1.11. Bebek formülleri ve devam formülleri	-	-	0,025
2.1.12. Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	-	0,025

Tablo 1. 4: Dünyada Bazı Ülkelerde Aflatoksinlerin Kabul Edilen Üst Limitleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (40, 51, 52)

Ülke	Gıda Maddesi	Aflatoksin ($B_1+B_2+G_1+G_2$) / B_1
Arjantin	Fıstık, Fıstık Ürünleri, Mısır ürünleri	20 / 5
Brezilya	0-2 Yaş ve Okul Çocukları Dışında kalan Endüstriyel Gıdalar	3 / -
	İthal Gıdalar	10 / 5
	Diğer Gıdalar	30 / 5
Kanada	Fıstık ve Fıstık Ürünleri	15 / -
Finlandiya	Tüm Besinler	5 / 2
Almanya	Tüm Besinler	0.05 / 2
Hollanda	Tüm Besinler	/ 5
Belçika	Tüm Besinler	5 / 5
Portekiz	Yer Fıstığı	/25
	Çocuk Gıdaları	/5
	Diğerleri	/20
Avusturya	Tüm Besinler	5 / 1
	Tahıllar, Fındık	5 / 2
İsviçre	Tüm Besinler	5 / 1
	Mısır, Tahıllar	5 / 2
İspanya	Tüm Besinler	/ 5
Lüksemburg	Tüm Besinler	/ 5
İrlanda	Tüm Besinler	/ 5
Danimarka	Tüm Besinler	/ 5
Yunanistan	Tüm Besinler	/ 5
A.B.D	Tüm Besinler	20 /

Tablolarda verilen değerler hem Avrupa birliği ülkelerinde hem de Türkiye’de sürekli değişiklik göstermektedir (40, 41, 136, 150, 151). Örneğin bir önceki yönetmelikte Türkiye’de gıda maddelerinde bulunabilecek en yüksek

aflatoksin B₁ düzeyi 8 ppb ve toplam aflatoksinin (B₁+B₂+G₁+G₂) üst sınırı ise 15 ppb olarak belirlenmiştir (151).

1.2.9. Aflatoksinlerin Analiz Metotları

Mikotoksin oluşturan mantarların yem ve diğer gıda maddelerine bulaşmaması için gereken özenin gösterilmesinin yanında, gıda maddelerinde mantarların üreme ve toksin oluşturma şartlarının da engellenmesi büyük önem arz etmektedir. Bu durum hem insan hem de hayvan sağlığının korunması açısından önemlidir. Mikotoksinlerin özellikle çiftlik hayvanlarının beslenmesinde kullanılan yem ve yem hammaddelerinde bulunması, hayvanlarda zehirlenmeler ve ciddi ekonomik kayıplara sebep olur. Bulaşık yemlerle beslenen çok sayıda hayvan böyle kirli yemlerden etkilenir. Bu nedenle mikotoksikozisten korunma büyük önem taşır. Mikotoksin zehirlenmelerinden korunmak ve tedavilerini rasyonel bir şekilde yapmak için öncelikle zehirlerin teşhis edilmeleri gerekir. Bu durum yem ve gıda maddelerinde bulunabilecek mikotoksinlerin kalitatif ve kantitatif olarak ispat edilmelerini kaçınılmaz hale gelmiştir. İnsan ve hayvanlarda akut, subakut ya da kronik tipte seyreden mikotoksikozis çok sayıda hastalık ile karıştırılabilir. Mikotoksikozisin diğer hastalıklardan kesin olarak ayırt edilebilmesi için laboratuvarlarda uygun yöntemlerle analiz edilmesi gereklidir. Mikotoksinlerin teşhisi, gıda güvenliğinin sağlanması ve gıda kökenli zehirlenmelerin kontrol altına alınması açısından büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla değişik analiz yöntemleri geliştirilmiştir (43, 47, 48).

Analiz yöntemlerinin aşağıdaki özellikleri taşıması istenir.

1. Duyarlılığı yüksek olmalıdır
2. Analizi yapılan toksine karşı yüksek özellik göstermeli, yanılmalara neden olmamalıdır
3. Yöntem çok sayıdaki maddeye uygulanabilmelidir (bitki, yem, et, süt vb)
4. Yapılan işlemler küçük manipülasyonlarla çok sayıda toksinin analizine olanak sağlamalıdır
5. Uygulanması basit olmalı ve zaman almamalıdır

6. Fazla pahalı olmalıdır. Özellikle rutin işlemlerde çok sayıda örneğin analiz edilebileceği göz önüne alındığında yöntemin fazla zaman almamasının ve ucuz olmasının önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

Yapılan araştırmalarla şimdiye kadar 300 civarında mikotoksin tespit edilmiştir. Sağlık açısından hepsi önemli olmakla birlikte yaygın bulunabilir olmaları nedeniyle beş ya da altı tanesi özellikle dikkati üzerine çekmektedir. Önem sırası ülkelere ve bölgelere göre farklılık göstermesine karşın araştırmacılar tarafından görüş birliğine varılan en önemli mikotoksinler arasında aflatoksinler, okratoksin A (OTA), fumonisinler, trikotesenler ve zearanelonon bulunur (4, 105). Diğer mikotoksinlerde olduğu gibi sterimatosistin, ergot alkaloidleri de zehirlenmeler yapmaktadır. Mikotoksikozis bölge ve mevsimlere bağlı olarak değişik şiddette ortaya çıkabilir.

Gıda ve yem maddelerinde değişik miktarlarda mikotoksinler bulunmaktadır (çok az miktarlardan, akut zehirlenmelere neden olacak şekilde oldukça yüksek miktarlara). Mikotoksinlerin seviyelerinin belirlenmesi zehirlenmelerin kontrolü açısından çok önemlidir. Bu nedenle gıda maddelerinde mikotoksinlerin toksinlere karşı çok duyarlı ve kesin sonuçlar veren yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (43). Fiziksel Muayene, Biyolojik ve Kimyasal Metotlar (Kromatografi, İmmünokimyasal Metotlar). Fiziksel muayene mikotoksinlerin kesin olarak teşhisine imkan vermez. Ancak bir mikotoksin riskinin bulunup bulunmadığı hakkında fikir verir. Bu nedenle analiz yönteminden ziyade teşhis yöntemi olarak düşünülebilir. Özellikle küflü yemlerin gözlenmesi, renk değişikliği, yemlerdeki nem oranı, gıdaların normal görünüm ve fiziksel özelliklerini kaybetmeleri kısmen de olsa akla mikotoksin taşıyabileceklerini getirmelidir. Analiz yapmanın mümkün olmadığı bölgelerde bu bulgular anemnez, zehirlenme belirtileri ve otopsi bulgularıyla birleştirildiğinde teşhise yakınlaşmaya imkan tanıyabilir. Ayrıca analiz için alınacak örnek seçimine de katkı yapar. Hangi analizin yapılacağına dair araştırmacıları yönlendirir.

Analizde biyolojik yöntemlerden faydalanılabilir ancak kimyasal yöntemlerin yeri ve önemi tartışılmaz. Mikotoksinlerin belirlenmesinde uzun zamandan beri kullanım alanı bulan başlıca kimyasal yöntemler arasında İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), Kolon Kromatografisi, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS), Enzim Bağlanmış

İmmunoabsorbant Yöntemi (ELISA) ve Enzim Aktivitesine Bağlı İmmunoteknik (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique/EMIT) metotları sayılabilir (22, 24, 25, 43, 94, 131). Mikotoksinlerin tanısı oldukça kompleks ve uzmanlık gerektiren bir konudur. Bunun çeşitli nedenleri vardır. Bunlardan biri analize alınacak materyallerin çeşitliliğinin fazla olmasıdır. Yem, yem hammaddeleri, et, süt, yumurta, meyve suları, meyveler, sebzeler vb gibi maddelerde mikotoksinler aranabilmektedir. Mikotoksinlerle kontamine olmuş bu maddelerin her biri farklı fiziksel ve daha da önemlisi kimyasal özellik taşır. Yem ve yem hammaddelerinde değişik yapı ve karakterde olabilmektedir. Çok sayıda çalışmalar yapılmasına rağmen şimdiye kadar mikotoksinlerin tümü için uygulanabilecek tek bir analiz metodu geliştirilememiştir (43, 104). Analiz metotları mikotoksin ve analiz edilecek örneğin çeşidine göre önemli değişiklikler göstermektedir.

Mikotoksinler tanınma yöntemine uygulanmadan önce buldukları ortamdan ayrılmaları gerekir. Bu işleme ekstraksiyon adı verilir ve analizin ilk aşamasını oluşturur. Bu aşamada toksin uygun çözücüye alınır. Bunun yanı sıra analizi engelleyecek ya da yanıltacak kirlilikler uzaklaştırılır. Ekstrakta toksinin yüksek oranda bulunması, kirliliklerin ise az oranda ya da hiç bulunmaması istenir. Eğer kirlilikler diğer bir deyişle analizde yanıltıcılara neden olacak madde konsantrasyonları yüksekse tekrar fiziksel ve kimyasal işlemlere tabi tutularak bunların miktarları düşürülür. Ekstraksiyon aşamasında yapılan bu işlemler mikotoksinlerin analizine katkıda bulunur, yanıltıcı ya da analizi engelleyecek maddeler uzaklaştırılır (43).

Ekstraksiyonda örnekler mikotoksini yüksek ancak kirlilikleri az oranda çözen solventlerle karıştırılır. Solventle temas eden mikotoksinler fiziksel olarak çözünerek solvente geçerler. Kullanılacak solventin seçiminde mikotoksinin çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır. Ancak bu yalnız başına yeterli değildir. Çünkü bu solventin mikotoksinler ile maksimum derecede, yeterli bir süre temas haline gelmesi gerekmektedir. Bunun için fiziksel ve kimyasal yöntemlerden faydalanılır. Analiz materyali iyice parçalanmalı, toz haline getirilmelidir. Ekstrakt solüsyonu ilave edildikten sonra karıştırılmalıdır. Karıştırılma mikserde yapıldığında başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Ekstraksiyon işleminde dikkat edilmesi gereken bir diğer husus da solventle beraber su ilave edilmesinin gerekliliğidir (yemlere). Su ilavesi

örneğin daha kolay parçalanmasına ve solventin gıda maddesine daha kolay geçmesine neden olmaktadır (41, 43, 102). Temas süresinin uzunluğu (toksinin çevre şartlarında parçalanmaması göz önüne alınmalıdır), su ilavesi ve karıştırma ekstraksiyonda verimliliği yükseltmektedir.

Ekstraksiyon aşamasında çeşitli organik çözücülerden yararlanılmaktadır. Çözücülerde aşağıdaki özellikler istenir.

1. Mikotoksini iyi çözmesi
2. Kirlilikleri az çözmesi
3. Materyale iyi dağılması

Bu çözücülerden en sık kullanılanlar arasında kloroform, diklorometan, etilasetat, asetonitril, metanol ya da metanol-su karışımı sayılabilir (43, 65, 102). Anfossi ve ark. (3) yoğurt ve peynir numunelerinde ELISA yöntemiyle aflatoksin M₁ belirlenmesine yönelik yapmış oldukları çalışmada bu ürünlerin ekstraksiyonunda sitrat solüsyonu kullandıklarını ve çok iyi sonuç elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Ekstrakte üründe aflatoksinden başka analiz sonucunu olumsuz etkileyebilecek yağ, protein ve pigment gibi kirliliğe neden olan maddeler de bulunmaktadır. Bu kirlilikler ekstraksiyondan önce uzaklaştırılabileceği gibi ekstraksiyondan sonra da çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılabilir (43, 156). Temizlemede sıvı-sıvı, sıvı-katı kromatografi (ayrı ayrı ya da bir arada kullanılması), presipitasyon ve dializ yöntemlerinden yararlanır. Bu yöntemlerden en fazla sıvı-sıvı ve sıvı-katı kromatografi kullanılmaktadır. Sıvı-sıvı kromatografi ayırma hunisinde, sıvı-katı ise kromatografi kolonlarında yapılır. Stoloff ve Trucksess adlı araştırmacılar sıvı-sıvı, sıvı katı kromatografik temizleme yöntemlerini birbirini takip edecek şekilde birlikte uygulamaktadır. Bu şekilde daha iyi temizleme elde edilebilmektedir (43, 47).

Sıvı-sıvı kromatografiyle temizleme işleminde uygun solvente alınan mikotoksin ve kirlilikler, mikotoksinleri çözmeyen, ancak kirlilikleri çözen ve solvent ile karışmayan çözücülerle temas ettirilir, karıştırılır. Kirliliklerin olduğu faz ayırma hunisinden uzaklaştırılır (102).

Sıvı-katı kromatografi içerisi adsorban madde ile doldurulmuş cam kolonlarda gerçekleştirilir. Adsorban yani sabit faz olarak en fazla silika jel ve

florosil kullanılır. Antikor affinite tipi kolonlarda bulunmaktadır. Bu yöntem sıvı-sıvı kromatografiye göre daha güvenli ve ekonomiktir (1, 5, 43).

Temizleme yönteminden hangisinin seçileceği mikotoksin ve numuneye göre değişmektedir (65). Aflatoksin ve zearelenon'un kolon kromatografisiyle temizlenme işleminde katı faz olarak silikajel, trikotesenlerde (Nivalenol, Deoksinivalenol) ise florosil kullanılmaktadır. Zearelenon ve Okratoksin A analizinde ekstraktların temizlenmesi için sıvı faz olarak 1 N sodyum karbonat ya da 0,1 N Sodyum bikarbonat solüsyonları kullanılmaktadır. Aflatoksin B₁, Okratoksin A, Sterigmatosistin, T-2 toxin ve Zearelenon analizinde dializ yöntemi ile temizlenme yapıldığı bilinmektedir (43, 48).

1.2.9.1 Biyolojik Metotlar

Biyolojik analiz metotları canlı materyaller üzerinde yapılmaktadır. Bu analiz metotları toksinlerin hücreler üzerine olan zararlı etkilerine dayanır. Ortaya çıkan zararlı etkiler birden fazla mikotoksin ve kimyasal maddeden kaynaklanabilir. Bu nedenle biyolojik metotlar yalnız başına mikotoksinlerin kesin teşhisi için yeterli değildir (80, 104). Biyolojik analiz yöntemlerine etken maddenin toksin olup olmadığı veya nedenin tam bilinmediği durumlarda başvurulur. Nitekim aflatoksinlerin ilk kez saptanabilmelerinde çok önemli rol oynamışlardır. Eğer aranması gereken mikotoksin kesin olarak biliniyor ve buna uygun analiz yöntemleri geliştirilmişse, o zaman analizde kimyasal metotlar tercih edilmelidir. Çünkü kimyasal metotlarla mikotoksinlerin tanısı oldukça güvenlidir. Ayrıca kimyasal metotlar ile çok düşük miktarlardaki mikotoksinlerin analizi yapılabilmektedir (80, 104). Bu nedenle biyolojik analiz yöntemleri pratikte kromatografi ve immünokimyasal metotlar kadar yaygın kullanılmamaktadır. Ancak mikotoksinlerin teşhisi açısından fiziksel muayeneye göre daha güvenli oldukları söylenebilir.

Biyolojik yöntemde toksinler kobay, tavşan vb hayvanlara ve hücrelere verilir ve ortaya çıkan etkiler değerlendirilir. Biyolojik materyal olarak hücre kültürleri, bakteriler, mantarlar, bitkiler, su canlıları, embriyolar ve kobay, tavşan gibi hayvanların ciltleri kullanılır.

Mikotoksinlerden bakterilerin ve mantarların olumsuz yönde etkilendiği bilinmektedir. Besi yerine ilave edilen toksinler mikroorganizmaların üremesini bloke edebilmektedir. Bunun en tipik örneğini günümüzde antibakteriyel amaçla kullanılan penisilinler vb oluşturmaktadır. Bu testler hücre kültürü testleri gibi çok nadir kullanılırlar. Ekstaktlar değişik konsantrasyonlarda hücre kültürlerine ya da besi yerlerine ilave edilir. Hücreler 37 °C'de 72 saat kadar inkübe edilir (hücre kültürü). Besi yerleri genelde 24-48 saat 37 °C'de bekletilir. Işık mikroskopunda hücre kültüründe gözlenen sitopatik etki, toksin verilmeyen kontrol gruplarıyla karşılaştırılır. Hücre kültüründe 0,01 µg miktardaki T-2 toksin, Diacetoxyscirpenoller sitopatik etkiyle tespit edilebilirler (43, 80, 104, 128). Besi yerlerine ekilmiş bakterilerinde üremeyi engelleyen konsantrasyonlar göz önüne alınarak toksinin bulunup bulunmadığına karar verilir. Elde edilen sonuçlar daha önce yapılmış standart çalışmalarla karşılaştırılır.

Cilt toksisite testi yalnızca dermatotoksik etkili mikotoksinlerin teşhisine imkan tanır. Trikotesen tip A (T-2 toxin, Diacetoxyscirpenol) ve makrosiklik Trikotesenler'in (Satratoksin, Vesrucarine, Roridin) teşhisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu toksinlerin kuvvetli iritan etkileri vardır. Traş edilmiş kobay derisi üzerine temas ettiklerinde ciltte yangıya neden olurlar. Ağrı, kızarıklık ve ödem görülür. Bu yöntemle kobay derisine uygulanan 0,1 µg T-2 toksin ve Diacetoxyscirpenol teşhis edilebilir. Doğal şartlar altında diğer mikotoksinlerin dermatotoksik etki göstermelerine pek rastlanılmamaktadır. (43, 128).

Embriyo testinde dömlü tavuk yumurtalarından faydalanılır. Analiz edilecek toksinin yüksek derecede embriyotoksik özellikte olması gerekmektedir (okratoksin, T-2 toksin gibi). Örnekten elde edilen temizlenmiş ekstraktlar distile su ve dimetilsulfoksit (1:1) karışımında çözündürülür. Bu solüsyondan 0,1-0,5 ml kadar en az 20 adet yumurtaya hava boşluğundan verilir. Yumurtalar kuluçkaya bırakılır ve 14 gün beklenir. Bu süre sonunda ölen embriyolar kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak zehirin olup, olmadığına karar verilir. Değerlendirmede standart çalışmalardan yararlanır. Yapılan çalışmalarla embriyotoksik doz T-2 toksin ve Diacetoxyscirpenol için 1 mg/yumurta, Okratoksin A için 10 mg/yumurta olarak bulunmuştur (43, 80, 104).

1.2.9.2. Kromatografik Metotlar

Mikotoksinlerin analizinde kimyasal yöntemlerin önemi büyüktür. Bunlar içerisinde kromatografik ve immünokimyasal yöntemler bulunur. Ekstraksiyonu yapılmış ve kirliliklerden iyice arındırılmış örnekler kromatografik işlemlere tabi tutulurlar. Bu araştırma metodunda analiz edilen bileşiklerin fiziksel-kimyasal özellikleri temel alınmaktadır. Maddelerin birbirlerinden buldukları ortamda farklı dağılım ve çözünürlük göstermesi nedeniyle ayrılması ve tanınması işlemlerini kapsar (18, 97). Kromatografi yöntemleri özelliği gereği hem temizleme hem de analizde kullanılmaktadır. Aflatoksinlerin analizinde İnce Tabaka Kromatografisi (İTK, TLC), Kolon Kromatografisi, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK, HPLC) ve Gaz Kromatografisi (GC) kullanılmaktadır. Ayırma işleminden sonra Aflatoksinlerin tanınması İTK'da ayıraçlarla veya UV ışığı altında floresans vermesiyle yapılır. Kolon Kromatografisinde de UV ışığından faydalanılır. HPLC ve GC'de tanıma işlemi spesifik dedektörler kullanılarak yapılmaktadır (18, 97).

İnce Tabaka Kromatografisi Türkiyede aflatoksinlerin analizi için en fazla kullanılan yöntemlerden biridir (43, 73). Bu yöntemde biri hareketli diğeri sabit olmak üzere iki farklı faz vardır. Aflatoksinler hareketli faz tarafından sabit faz üzerinde sürüklenirken moleküler özelliklerine (çözünürlük, yoğunluk) göre farklı hızda hareket ederler. Farklı hareket ya da sürüklenme hızı maddelerin birbirinden ayrılmasına neden olur. Bu dağılım sıvı-katı ya da gaz-katı kromatografik yöntemlerin temel prensibini oluşturmaktadır.

Hareketli faz olarak Toluol, Etilasetat, Formik asit, 6:3:1, Kloroform, Aseton, Hekzan 142:25:33 (oranında) gibi değişik kimyasal çözücüler, sabit faz olarak genellikle polar özellik gösteren silikajel kullanılmaktadır. Bu yöntemde sabit faz üzerine uygulanan numuneler hareketli faz yardımıyla sürüklenirler. Numunede bulunan moleküllerin sürüklenme hızı birbirinden farklılık göstermektedir. Bu farklılık maddelerin birbirlerinden ayrılmasına neden olur. Sonra görülebilir şekle dönüştürülen örnekler değerlendirilmeye alınmaktadır (43, 102).

İnce Tabaka Kromatografisi yönteminde önce plakalara silika jel kaplanır, plakalar kurutulur ve ısı işlemiyle aktif hale getirilir (60 °C'de yaklaşık 1-2 saat). Plakalar bir kalemle uygun şekilde bölmelere ayrıldıktan sonra bir ucuna analizi

yapılacak olan numuneler mikropipetlerle uygulanır. Analiz edilecek maddeye göre hacmi değişmekle birlikte numuneler genelde 5-10 mikrolitre kadar spotlanmaktadır. Aflatoksinlerle çalışırken mikotoksinleri ışığa olan duyarlılıkları daima göz önünde bulundurulmalıdır. Parçalanmayı önlemek için hızlı ve düşük ışık yoğunluğu altında çalışılmalıdır (44, 48). Uygulama yapıldıktan sonra plakalar hızla kurutulup, içerisinde hareketli fazın bulunduğu tanklara yerleştirilir. İşaretlenmiş yüksekliğe hareketli fazın ulaşmasından sonra plakalar tanktan çıkarılarak kurutulur. Plakalar değişik metotlarla incelenerek maddeler tanınmaya çalışılır. Bu tanınma noktalarından birisi maddelerin Rf değerleridir. Rf değeri aflatoksinin sabit faz üzerinde aldığı yolun hareketli fazın aldığı yola oranıdır. Yöntemlerde standart maddeler ile Rf değerleri belirlenmiştir. Plakalarda standart olarak kullanılan saf toksinin Rf değeri ile numunedeki maddelerin Rf değeri karşılaştırılır. Standart (miktarı bilinen aflatoksin) lekesiyle aynı hizada olan ve aynı renk gösteren leke aflatoksin olarak değerlendirilir.

Tankta yürütölmüş plakalarda aflatoksinin bulunup bulunmadığı UV ışığı (UV ışığında 254 nm ve 366 nm dalga boyunda) altında inceleme ya da aflatoksinlerle renk veren ayıraçlar püskürtölerek yapılır. Değerlendirmede ikisi birlikte de kullanılabilir. Mikotoksinler UV ışığı altında mavi (B türevleri) ya da yeşil (G türevleri) renkte floresans verirler. Teşhiste bu renkler değerlendirmeye alınır. Aflatoksin B₁ ve G₁'in izole edilmesinde trifloroasetik asitten de faydalanılmaktadır (floresans özellik için) (43, 102).

Lekelere farklı ayıraçlar püskürtöldükten sonra elde edilen renk reaksiyonları identifikasyonda kullanılır. (Örnek; H₂SO₄, %20' lik AlCl₃ solüsyonu ya da amonyak buharı). Bu şekilde İTK'da aflatoksinler kalitatif ya da yarı kantitatif olarak teşhis edilir. İTK'da mikotoksinler 0,005-500 µg/Kg sınırları arasında ispat edilebilmektedir (31, 43, 44, 48, 95, 9, 148).

İnce Tabaka Kromatografisinde numunede fazla bulunacak kirlilikler analizi olumsuz yönde etkiler. Bu durumda numune uygulanmış plakalar, tankta ikinci bir uygulamaya tabi tutulurlar. Plakalar birinci tanktan çıkarılıp 45 derece çevrilerek ikinci tanka yerleştirilirler. Bu yürütmeden sonra birinci yürütmede aflatoksinleri maskeleyen kirlilikler ayrılır ve mikotoksin daha kolay tespit edilmiş olur.

İnce Tabaka Kromatografisinde aflatoksinlerin analizindeki en önemli sorunlardan biri tayinin semikantitatif olmasıdır. Zehirlenmelerin teşhisi açısından bu yöntem her ne kadar yeterli kabul edilse de araştırmalar da miktarın kesin teşhisi açısından sorun doğurabilir, yanımlara neden olabilir. Bu sorun için tabakaların değerlendirilmesinde göz yerine cihazlardan da yararlanılabilmektedir. Dc-Scanner plakaların kantitatif olarak değerlendirilmesine imkan verebilmektedir. Aflatoksin, Zearelenon ve Trikotesen tip A'nın analizinde silikajel doldurulmuş mini kolonlardan da faydalanılmaktadır. Ancak İTK'ya göre üstünlüğü pek bilinmemekte ve İTK kadar yaygın kullanılmamaktadır.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yüksek duyarlılığı nedeniyle mikotoksin ve diğer çok sayıdaki kimyasal maddenin analizinde kullanılmaktadır. Analiz edilecek maddelerin molekül ağırlıklarının düşük olması analizde verimi yükseltir. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi cihazı başlıca hareketli faz, pompa, enjektör bloğu, kolon ve dedektör kısımlarından oluşmaktadır. Mikotoksinler numunelerden ekstrakte edildikten sonra temizlenirler. Sonra HPLC cihazına verilerek analiz edilirler. Bu yöntemin İTK'ya göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bu avantajların en önemlisi sonucun daha kesin ve güvenilir olmasıdır (33, 43, 66). Cihazın duyarlılığı yüksektir. Bu özellikleri nedeniyle araştırmalarda tercihen kullanılır. Aflatoksin ve diğer maddelerin analizinde kullanılan HPLC yönteminin İTK ve diğer yöntemlere göre bazı dezavantajları da bulunmaktadır (33). Bunlardan biri cihazın numunedeki kirliliklerden kolay etkilenmesidir. Bu nedenle kolon kirliliğini önlemek için ekstrakt temizleme işlemine daha fazla özen gösterilmelidir. Analizde kirliliğin fazla olması kolonun temizlenmesi için daha fazla beklemeyi gerektirebilir. Bu durum zaman ve enerji kaybına neden olur. Numunedeki fazla sayıda bulunacak kirlilik veya madde uzun süre beklemeyi gerektirebilir. Bir kerede sadece bir örnek analiz edilebildiğinden uzun süre bekleme günlük analiz edilebilecek örnek sayısını düşürür. İTK'ya göre en büyük dezavantajından biri ise cihazın pahalı olmasıdır. Daha fazla enerjiye gereksinim duyulur. Ayrıca cihazı kullanacak personelin ve teknik elemanların iyi yetişmiş olması şarttır.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografinin İTK'dan en önemli farkı taşıyıcı hareketli sıvı fazın kendi kendine yürümesi yerine bir pompa ile kolona basınçla verilmesidir. Duyarlılığının yüksek olması ve hareketli fazın basınçla verilmesi

nedeniyle bu kromatografi tipine yüksek performanslı sıvı kromatografisi adı verilmiştir (106).

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografiye enjekte edilen numune basınçlı bir pompa nedeniyle kolona verilen sıvı ile sürüklenerek dedektöre ulaştırılmaktadır. Kolonda basınçlı sıvı ile sürüklenen maddeler, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre değişik sürelerde çıkarlar. Bu esnada birbirlerinden ayrılırlar. Dedektör bu maddeleri tespit ederek değişik sürelerde kromatogramlarını verir. Maddenin özelliğine göre değişik zamanda ve miktarına göre de değişik büyüklükte kromatogramda impulsalar elde edilir. Sonuçlar standart ve numunedeki kromatogram impulsaları mukayese edilerek değerlendirilir.

Analizde kullanılan bu taşıyıcı sıvı, diğer bir deyişle hareketli faz çeşitli organik maddelerden oluşmaktadır. Bu maddeler arasında metanol, etanol, asetonitril, etilasetat, kloroform, su ve ya bu maddelerin değişik oranlardaki karışımları sayılabilir. Katı faz İTK'dan farklı olarak kolonlar içerisine doldurulmuştur. YBSK cihazında kullanılan kolonların iç çapı 4,5-5 mm, uzunluğu 10-30 cm olup, genelde paslanmaz çelikten yapılmışlardır (43, 55, 66). Kolonlarda katı faz olarak en fazla alüminyum oksit, silisyum dioksit gibi tozlar kullanılır (106).

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisinde belirlenme dedektörler aracılığıyla olur. Dedektöre gelen maddeler elektriksel bir sinyale dönüştürülür. Bu nedenle analizde dedektörlerin özellikleri önemli bir yer tutar. Dedektörün duyarlılığı YBSK ile yapılan analizin sonucunu doğrudan etkiler. Dedektörün analizi yapılan ve diğer taşıyıcı maddelere karşı duyarlılığının yüksek olması istenir. YBSK'de kullanılan UV, floresans gibi dedektörler kullanılmaktadır. Aflatoksinlerin analizinde UV, floresans ve MS dedektörleri kullanılmaktadır. Aflatoksinler yaklaşık 360 nm dalga boyundaki UV ışığında kuvvetli absorpsiyon vermektedir. Bu dalga boyunda taşıyıcı faz olarak metanol kullanılarak aflatoksinler analiz edilebilmektedir. Aflatoksinler yüksek duyarlılığa sahip dedektörler (Fluoresans Dedektör, Elektrokimyasal Dedektör) yardımıyla pikogram düzeyinde belirlenebilmektedir (43, 63, 66, 83, 129, 134). Ancak her dedektör bütün mikotoksinlerde aynı derecede yüksek duyarlılık göstermez. Dedektörlerin duyarlılığı değişiklik gösterir. Bu nedenle mikotoksinlerin analizinde farklı dedektörlerden yararlanılır. Örneğin; aflatoksin, fumonisin ve okratoksin A'nın YBSK ile analizinde floresans dedektör, trikotesenlerin analizinde

ise UV veya DAD dedektörü kullanılmalıdır (43, 63, 66, 83, 129, 134). Mikotoksinlerin (aflatoksinler dahil) YBSK ile teşhisinde daha çok floresans dedektör kullanılır. Çoğu mikotoksin bu dedektörle 343 nm ile 445 nm dalga boyu arasında aranır. Retensiyon zamanı göz önüne alınarak sonuca varılır. Bu zaman standart madde ile doğrulanır. Yapılan çalışmalarda mikotoksinlerin bazı şartlardaki retansiyon zamanları belirlenmiştir. Örneğin fumonosinler (metanolde çözündürülüp, pH'sı 3.15 olan 0,1 M fosfat solüsyonu ile 0,8 mL/dak hızda verilen taşıyıcı fazda) floresans dedektörde 13 dakikalık bir retensiyon zamanı gösterirler. Retensiyon zamanı enjeksiyon ile pik çizgisinin elde edilinceye geçen zaman olarak tanımlanır. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi araştırmalar başta olmak üzere rutin analizlerde kullanılmaktadır. Ayrıca yüksek duyarlılık ve güvenliğe sahip olması nedeniyle mikotoksinlerin analizlerinde doğrulama yöntemi olarak da önem taşımaktadır. Mikotoksinlerin metabolit ve enantiomerlerinin tespitine de imkan tanır. Örneğin; cis ve trans zearelenon ya da alfa ve beta zearelenon'un ayrımı gerçekleştirilebilir Bu yöntemin duyarlılığı mikotoksin türüne göre değişmekle birlikte 0,005-1 µg/Kg civarındadır. Gelişmiş laboratuvarlarda mikotoksin analizlerinde en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir (43, 93, 96).

Gaz-Sıvı Kromatografisi (GLC) mikotoksin analizinde kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu yöntemden isminden de anlaşılacağı gibi hareketli faz gaz, sabit faz ise sıvı ya da katıdır. Sabit faza göre GLC, gaz-sıvı ya da gaz-katı kromatografi olarak adlandırılabilir. Gaz-sıvı kromatografi analizlerde fazlaca kullanılmaktadır (76). Bu yöntem ile taşıyıcı, diğer bir deyişle hareketli faz gaz olduğundan kolay sürüklenen maddeler analiz edilebilmektedir. Bu nedenle analiz edilecek maddelerin gaz, kolay buharlaşabilir ya da düşük molekül ağırlıklı olmaları gereklidir. Bunların dışında bazı maddeler kromatografiye enjekte edilmeden önce uçucu bileşiklerine türevlendirilerek de analiz edilebilmektedir. Mikotoksinlerin çoğu uçucu olmadığından gaz kromatografisine verilmeden önce mutlaka türevlendirilmesi gereken maddelerdendirler. Bu şekilde gaz haline geçen ya da kolay buharlaşan maddeler gaz-sıvı kromatografi yardımıyla analiz edilirler. Aksi durumlarda zehirler gaz ile dedektöre taşınamayacağından ya da taşınmaları çok uzun süre alacağından analizlerini bu yöntemle yapmak mümkün değildir. Burada dedektör duyarlılığını da göz önüne almak gerekmektedir. Bu durum yöntemin

YBSK'den (hareketli faz sıvı ve basınçla verilmektedir) önemli bir farkını oluşturur (20, 43, 76).

Enjektör ile kolona verilen numune gaz yardımıyla kolondan geçirilerek ayrıştırılır ve dedektöre ulaştırılır. Hareketli faz olarak kullanılan gazlar hidrojen, helyum ve azottur. Bu gazlar inert olup, analizi yapılan maddeler ile reaksiyona girmezler. Sadece kolondan geçirek dedektöre ulaşmasına yardımcı olurlar. Dedektöre ulaşan madde elektriksel uyarılar halinde kromatograma yansır.

Gaz-Sıvı Kromatografisinde değişik çap ve uzunlukta cam kolonlardan yararlanılır (3-5 cm çap, 30-40 cm uzunluk). Hatta mini kolonlardan da yararlanılmaktadır (15 mm uzunluk). Kullanılan kolonun OH grupları mikotoksinleri bağlayarak akıcılığı düşürebilir. Bu nedenle kolonlar analizden önce N metil-bisitrifluoroasetamid, Tri-Sil/TBT ya da N-Heptafluorbutyrylimidazol gibi çeşitli maddelerle muamele edilir. Bu işlem amacına göre desilenizasyon olarak da adlandırılabilir.

Gaz-sıvı kromatografide kullanılan çeşitli dedektör tipleri geliştirilmiştir. Bunların başlıcaları Flammenionization dedektör (FID), elektron yakalayıcı dedektör (ECD) ve Massenspektrofotometre (MS)'dir. Mikotoksinlerin analizinde en fazla FID ve ECD dedektörlerden yararlanılır. Dedektöre gelen kimyasal maddeler elektriksel uyarıya çevrilerek kromatogramlara çizdirilir. Standart ve numunedeki aynı retensiyon zamanlarına denk gelen pikler hacim olarak ölçülerek değerlendirilir. Gaz ve numunedeki kirlilikler sonucu YBSK'de olduğu gibi olumsuz etkileyebilir (20, 43). Bu nedenle temizleme işlemine özen gösterilmelidir.

Gaz-sıvı kromatografik analiz yöntemi, aflatoksinlerin yanında kimyasal özellikleri nedeniyle öncelikle Trikotosen'lerin teşhisinde kullanılmaktadır. Deoxynivalenol (DON), HT-2 ve T-2 toksinin tahıl ve tahıl ürünlerinde belirlenmesinde sıklıkla gaz-sıvı kromatografi yönteminden faydalanılmaktadır. Trikotosenler ECD dedektör ile analiz edilirler. Trikotosenlerin analizi YBSK ile yapıldığında ise floresans dedektörden faydalanılmaktadır (43, 78).

Gaz-sıvı kromatografi masspektrofotometresi (kütle spektrofotometre) ile birlikte kullanıldığında daha güvenli bir sonuç elde edilmektedir. Çünkü analiz edilecek örneklerde çok sayıda bulunan kirlilikler yanılmalara neden olmaktadır. Gaz-sıvı kromatografi kütle spektrofotometresiyle birlikte kullanıldığında yüksek

seçkinlik ortaya çıkar ve daha güvenli kantitatif sonuçlara ulaşılır. İyonize edilen (kimyasal olarak) maddeler çeşitli fragmentlere parçalanmaktadır. Kütle filtresinden geçirilerek analiz edilir (20). Elde edilen pigler retensiyon zamanlarına göre değerlendirilir. Sonuçlar bir bilgisayar programı ile elde edilebilir. YBSK'de de sonuçlar bilgisayar programlarıyla elde edilebilmektedir. Trikotesenlerin teşhisinde gaz-sıvı kromatografi ve kütle spektrofotometresi kullanılmaktadır. Bu yöntem ile 10-200 µg/Kg miktarındaki Trikotesenler ispat edilebilir (43, 123).

1.2.9.3. İmmunokimyasal Metotlar

İmmunokimyasal metotlar antijen ve antikor reaksiyonları esasına dayanır. Burada antijen ile antikor birbirine hidrojen, hidrofobik ya da elektrostatik olarak bağlanmıştır. Bu bağlanma şekli diğer bir deyişle geri dönüşümlüdür. Antijen ya da antikorların pleytlerin yüzeyine bağlanma şekilleri de benzer tarzdadır. İmmunokimyasal yöntemlerde kullanılan antijenler analizi yapılacak olan mikotoksinlerdir. Antikorlar ise deney hayvanlarında üretilmektedir. Hayvanlara küçük dozda belirli tekrarlarla verilen antijenlere karşı yaklaşık 2-3 hafta sonra antikor elde edilebilmektedir. Buradaki en önemli sorun antijenin immünojenik özellikte olmasıdır (protein ya da hapten). Mikotoksinler yalnız başlarına bu şartları taşımayan düşük molekül ağırlıklı maddelerdir. Bu nedenle bir protein ile bağlanarak vücuda verilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle serum albümini, gamma globulin ve polyisin molekülleri gibi makromoleküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu proteinlerle mikotoksinler reaksiyona sokularak (bir araya getirilerek) antijenik özellik elde edilir. Ancak, her mikotoksin bu proteinlerle doğrudan reaksiyon vermemektedir. Penisillik asit, patulin ve okratoksin gibi reaktif gruplara sahip olan mikotoksinler doğrudan reaksiyona girebilirken aflatoksinler girememektedir. Bu nedenle aflatoksinler ve trikotesenler reaktif grup taşımadığından proteinlerle birleştirilmeden önce karboksil grup taşıyan başka bir maddeyle birleştirilmeye ihtiyaç duymaktadır (20, 33, 43).

Mikotoksinlerin teşhis edilmelerinde immunokimyasal yöntemlerden biri Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) çok kullanılmaktadır. Bu yöntemin kromatografik yöntemlere göre bazı üstünlükleri vardır. Bunlar;

1. Çok sayıda numune kısa sürede işlenebilmektedir.
2. Bazı numuneler işlenmeden doğrudan kullanılabilir (serum, idrar, süt gibi).
3. Duyarlılığı oldukça yüksektir.
4. Diğer yöntemlere göre daha ucuzdur.

Bu yöntemde sıvı örnekler doğrudan uygulanabilirken, peynir, yem gibi maddeler ekstraksiyona tabi tutulmalıdır. Ekstraksiyon için genellikle metanol-su karışımı kullanılmaktadır. Diğer yöntemlerde olduğu gibi temizlenme işlemine de ihtiyaç duyulmaktadır. ELISA yönteminin en büyük dezavantajı ise mikotoksin türevleri arasında çapraz reaksiyonun ortaya çıkmasıdır. Bu durum aynı tür mikotoksinlerin çeşitleri arasında ortaya çıkabilir. Örneğin; aflatoksin B₁ ile aflatoksin M₁ arasında olduğu gibi. Bu çapraz reaksiyon az da olsa sonuçlarda yanlışlıklara neden olabilir (34, 43, 96, 107, 121).

İmmüno kimyasal yöntemler analizlerde farklı şekilde kullanılabilir. En fazla yüzeyi toksine karşı spesifik antikorlarla kaplanmış pleytler kullanılmaktadır (ELISA). Bu yöntem antikorlara karşı serbest ve işaretlenmiş (konjugat) antijenlerin yarışması esasına dayanmaktadır. Konjugat enzim taşıdığından ne kadar yüksek oranda bağlanırsa o oranda pleytlere ilave edilecek olan substratı (örneğin tetrametilbenzen) işleyerek renk farklılığına neden olur. Oluşan bu renk fotometrik olarak ölçülür (22, 25, 43). Sonuçlar kontrol gruplarıyla mukayese edilerek değerlendirilir.

İmmüno kimyasal yöntemler ile aflatoksinlerin yanında farklı mikotoksinler de tespit edilebilmektedir. Yöntemin duyarlılığı işlenen örneğe ve çalışma şartlarına göre değişir. Bu yöntemle yaklaşık olarak 0,0025-20 µg /Kg arasında mikotoksin tespit edilebilmektedir (43, 107).

Bu araştırmada hayvancılık ve hayvan ürünleri açısından Türkiye’de önemli bir yere sahip olan Ardahan ilinden toplanan süt ve kaşar peynirlerinde AFM₁ düzeylerinin ELISA yöntemiyle tespit edilmesi amaçlanmıştır. Araştırmada AFM₁ miktarının mevsimlere göre değişip, değişmediği belirlenecektir. Bölgede muhtemel AFM₁ zehirlenmesi riski ortaya çıkarılacaktır. Elde edilen bilgilerin insan ve hayvan sağlığının korunması için gereken önlemlerin alınmasına hizmet edeceği düşünülmektedir.

2.MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Süt Numuneleri

Süt numuneleri Ardahan ili merkezi ile Göle, Çıldır, Hanak, Damal ve Posof İlçelerinde üretim yapan yetiştiricilerden sağlandı. Bir mevsimde her yerleşim biriminden 10 adet süt numunesi olmak üzere 60 numune toplandı. Yıl boyunca 240 adet çiğ sığır sütü üreticilerden alınarak analiz edildi. Numunelerin her biri taze sağılmış sütlerin bulunduğu kovalardan rastgele 10 ml miktarında alınarak tüplere konuldu. Soğuk ve karanlık ortamda laboratuvara getirilerek bekletilmeden santrifüjleri yapıldı ve analiz edilinceye kadar -18 °C'de karanlıkta buzdolabında bekletildi. İşlemler her mevsimde aynı şekilde tekrar edildi. Süt numunelerinin toplandığı yerler ve tarihleri Tablo 2. 1'de sunulmuştur.

2.1.2. Kaşar Peyniri Numuneleri

Kaşar peynir numuneleri Ardahan ili merkezi ile Göle, Çıldır, Hanak, Damal ve Posof İlçelerinde üretim yapan yetiştiricilerden sağlandı. Bir mevsimde her yerleşim biriminden 10 adet kaşar peyniri numunesi olmak üzere toplam 60 numune alındı. Yıl boyunca 240 adet peynir numunesi toplanarak laboratuvarında analiz edildi. Numuneler rastgele seçilen kaşar peynirlerinin dış kabukları soyulduktan sonra iç kesitlerinden 10 g alınarak naylon poşetlere konuldu. Soğuk ve karanlık bir ortamda laboratuvara getirilerek analizleri yapılmaya kadar -18 °C'de karanlıkta saklandı. İşlemler her mevsimde aynı şekilde tekrar edildi. Peynir numunelerinin toplandığı yerler ve tarihleri Tablo 2. 1'de sunulmuştur.

Tablo 2. 1: Numunelerin Toplandığı Merkezler ve Tarihleri

Numune Yeri	Numune	Mevsim	Tarih	Numune Sayısı
Ardahan	Kaşar Peyniri	Yaz	01.07.2009	10
Damal	Kaşar Peyniri	Yaz	02.07.2009	10
Hanak	Kaşar Peyniri	Yaz	03.07.2009	10
Göle	Kaşar Peyniri	Yaz	04.07.2009	10
Posof	Kaşar Peyniri	Yaz	05.07.2009	10
Çıldır	Kaşar Peyniri	Yaz	06.07.2009	10
Ardahan	Kaşar Peyniri	Sonbahar	01.10.2009	10
Damal	Kaşar Peyniri	Sonbahar	02.10.2009	10
Hanak	Kaşar Peyniri	Sonbahar	03.10.2009	10
Göle	Kaşar Peyniri	Sonbahar	04.10.2009	10
Posof	Kaşar Peyniri	Sonbahar	05.10.2009	10
Çıldır	Kaşar Peyniri	Sonbahar	06.10.2009	10
Ardahan	Kaşar Peyniri	Kış	01.01.2010	10
Damal	Kaşar Peyniri	Kış	02.01.2010	10
Hanak	Kaşar Peyniri	Kış	03.01.2010	10
Göle	Kaşar Peyniri	Kış	04.01.2010	10
Posof	Kaşar Peyniri	Kış	05.01.2010	10
Çıldır	Kaşar Peyniri	Kış	06.01.2010	10
Ardahan	Kaşar Peyniri	İlkbahar	01.04.2010	10
Damal	Kaşar Peyniri	İlkbahar	02.04.2010	10
Hanak	Kaşar Peyniri	İlkbahar	03.04.2010	10
Göle	Kaşar Peyniri	İlkbahar	04.04.2010	10
Posof	Kaşar Peyniri	İlkbahar	05.04.2010	10
Çıldır	Kaşar Peyniri	İlkbahar	06.04.2010	10
Ardahan	Çiğ Süt	Yaz	01.07.2009	10
Damal	Çiğ Süt	Yaz	02.07.2009	10
Hanak	Çiğ Süt	Yaz	03.07.2009	10
Göle	Çiğ Süt	Yaz	04.07.2009	10
Posof	Çiğ Süt	Yaz	05.07.2009	10
Çıldır	Çiğ Süt	Yaz	06.07.2009	10
Ardahan	Çiğ Süt	Sonbahar	01.10.2009	10

Damal	Çiğ Süt	Sonbahar	02.10.2009	10
Hanak	Çiğ Süt	Sonbahar	03.10.2009	10
Göle	Çiğ Süt	Sonbahar	04.10.2009	10
Posof	Çiğ Süt	Sonbahar	05.10.2009	10
Çıldır	Çiğ Süt	Sonbahar	06.10.2009	10
Ardahan	Çiğ Süt	Kış	01.01.2010	10
Damal	Çiğ Süt	Kış	02.01.2010	10
Hanak	Çiğ Süt	Kış	03.01.2010	10
Göle	Çiğ Süt	Kış	04.01.2010	10
Posof	Çiğ Süt	Kış	05.01.2010	10
Çıldır	Çiğ Süt	Kış	06.01.2010	10
Ardahan	Çiğ Süt	İlkbahar	01.04.2010	10
Damal	Çiğ Süt	İlkbahar	02.04.2010	10
Hanak	Çiğ Süt	İlkbahar	03.04.2010	10
Göle	Çiğ Süt	İlkbahar	04.04.2010	10
Posof	Çiğ Süt	İlkbahar	05.04.2010	10
Çıldır	Çiğ Süt	İlkbahar	06.04.2010	10

2.1.3. Aflatoksin M₁ ELISA Test Kiti

Aflatoksin analizi Enzim Immunoassay yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem örneklerdeki AFM₁ düzeylerinin kantitatif olarak ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Bu amaçla araştırmada Ridascreeen, Aflatoksin M₁ Art. No.: R1101 (R-Biopharm GmbH, Germany) test kitleri kullanıldı (119). Yöntem için ihtiyaç duyulan konjugat dâhil tüm ayıraçlar (Standart Solusyonlar, Substrat Kromojen, Stop Solüsyonu, Buffer 1, Buffer 2, Yıkama Solüsyonu) analize hazır test kitleri halinde bulunmaktadır. Bir test kiti ile standartlar dâhil olmak üzere 96 adet numunedeki AFM₁ kalıntıları ölçülebilmektedir. Pleytlerin uygun şekilde hazırlandıktan sonra mikrotitrasyon ile elde edilen renk farklılığı spektrofotometrik olarak ölçüldü (119).

2.1.4. Sarflar

2.1.4.1. Kimyasal Maddeler ve Solventler

Peynir numunelerinin işlenmesinde aşağıdaki malzemeler kullanıldı.

Diklorometan (M.106049.2500, Merck)

n-heptan (M.104365.2500, Merck)

Metanol (M.106008.2500, Merck)

Sodyum Dihidrojen Fosfat Hidrat (M.106349.1000, Merck)

Disodyum Hidrojen Fosfat-2- Hidrat (M.106580.0500, Merck)

Sodyum Klorit (M.106404.0500, Merck)

2.1.4.2. Diğer Malzemeler

Dereceli Pipetler, Pastör Pipetleri, Mikro Pipetler (50, 100 ve 400'lük), Cam Kaplar, Whatman No 1 Filtrelerinden yararlanıldı.

2.1.5. Analizde Kullanılan Cihazlar

Araştırmada Derin Dondurucu, Spektrofotometre (ELISA okuyucu, Biotek), Santrifüj, Karıştırıcı, Rotapavor, Tartım Cihazı kullanıldı.

2.2. Metot

Süt ve Kaşar peynir numunelerinde AFM₁ analizi R-Biopharm GmbH tarafından bildirilen ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi (119).

2.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

2.2.1.1. Aflatoksin M₁- Enzim Konjugat Solüsyonu

Aflatoksin M₁- enzim konjugat (kırmızı kap) satın alınan kit içerisinde bulunmakta olup, yoğun olduğundan dilüe edilerek kullanıldı. Pipetlemeden önce enzim konjugat karıştırıldı. Daha sonra bu enzim konjugat 1:11 (1+10) oranında Kit içerisinde bulunan buffer 2 solüsyonu ile (Beyaz kapaklı kap), 400 µl enzim konjugat + 4.0 ml buffer 2 karıştırılarak seyreltildi.

2.2.1.2. Fosfat Buffer Solüsyonu

Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS); pH 7,2: 0.55 g sodyum dihidrojen fosfat hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) + 2.85 g disodyum hidrojen fosfat-2- hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) + 9 g Sodyum klorit (NaCl) 1000 ml distile suya tamamlanarak hazırlandı.

2.2.1.3. Yıkama Solüsyonu

Yıkama Solüsyonu olarak kit içerisinde toz halinde hazır halde temin edilen yıkama tuzu üzerinde açıklanan tarifeye göre 1 litre distile suda çözdürülerek hazırlandı. Bu çözelti pleytlerin yıkanmasında kullanıldı.

2.2.2. Süt Numunelerinin Analize Hazırlanması

Yağ tabakasının ayrılması için süt örnekleri 3500 devirde ve 10 °C'lik ısıda 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki krema tabakası bir pastör pipeti aracılığıyla tamamen uzaklaştırıldı. Daha sonra yağı alınmış süt (üst tabakası-

yağı atılmış süt) numunesinden 2 ml kadar alınıp godelere konuldu ve test işlemi yapılmaya kadar karanlık ortamda, dondurucuda (-18 °C) saklandı. Test işlemi esnasında 10 °C'ye kadar ısıtıcıda ısıtıldı ve direkt olarak kit kuyucuklarına 100 µl uygulandı.

2.2.3. Peynir Numunelerinin Analize Hazırlanması

Peynirlerin yüzeylerinde mantar üreme olasılığı olabileceği düşünüldüğünden dolayı peynirlerin dış yüzeyleri analiz için kullanılmadı. Peynir numunesinin iç kısımlarından 2 g tartılarak alındı. Mümkün olduğunca küçük parçalara ayrıldı. Cam balona aktarılan peynir örneklerinin üzerine 40 ml diklorometan ilave edilip, iyice karıştırıldı. Karıştırıcıda 15 dakika kadar bekletildi. Daha sonra elde edilen süspansiyon whatman no 1 filtresinden süzüldü. Filtratın 60 °C'de rotapavor yardımıyla uçurularak yoğunlaştırıldı. Bu kalıntıya 0,5 ml metanol, 0,5 ml PBS ve 1 ml n-heptan ilave edilip karıştırıldı. Karışım santrifüj tüpüne aktararak 15 °C'de 2700 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda üstteki tabaka uzaklaştırıldı. Altta kalan metanol-su fazından bir pastör pipeti aracılığıyla 100 µl alınarak üzerine 400 µl buffer 1 solüsyonu (kit içerisinde hazır temin edilen) ilave edildi (1:5 seyreltme) ve bundan test için pleytlerin her kuyucuğuna 100 µl konuldu.

2.2.4. Yöntemin Çalışma Prensibi

Testin çalışma prensibi antikor antijen reaksiyonuna dayanır. Antikorlara karşı işaretlenmemiş ve işaretlenmiş antijen yarıştığı için yöntem kompetitif enzim immunoassay olarak adlandırılır. Bu yöntemde AFM₁'e karşı hazırlanmış spesifik antikorlar mikrotitre şeklinde pleytlerin kuyucuklarına kaplanmıştır. Antikorla kaplanmış kuyucuklara AFM₁ standardı ya da örnek solüsyonu konur, beklenir. Standarttaki antijenler ya da numunede bulunabilecek antijenler antikora bağlanır. Sıvı boşaltılır, kuyucuklar yıkanır. Bundan sonra kuyucuklara enzim-konjugat solüsyonu ilave edilir, beklenir. Enzim bağlı konjugat, bağlı olmayan antikorlara tutunur. Bu solüsyon da boşaltılır, kuyucuklar yıkanır. Burada standart ya da numunede bulunan serbest AFM₁ ve AFM₁- enzim konjugatı, AFM₁ antikorlarına

karşı bir nevi yarışır. Bağlı olmayan AFM₁ veya AFM₁-enzim konjugat (AFM₁-enzim) artıkları yıkılarak kuyucuklardan uzaklaştırılmaktadır. Daha sonra enzim (üre peroxidase) ve kromojen (tetramethylbenzidine) solüsyonları her kuyucuğa peş peşe birlikte ilave edilir ve beklenir. Enzim konjugat (AFM₁-enzim) bağlanırsa renksiz kromojen mavi ürüne dönüşür. Reaksiyonu durdurma solüsyonu ilave edildiğinde mavi renk sarıya kaymaktadır. Ortaya çıkan bu renk fotometrik olarak 450 nm dalga boyunda ölçülür. Opsiyonel referans dalga boyu 600 nm den büyüktür.

Eğer örnekte AFM₁ varsa, kuyucukta bulunan antikora bağlanmaktadır. Bu durum peşi sıra kuyucuklara ilave edilen enzim-konjugat'ın (AFM₁-enzim) antikora bağlanmasını engellemektedir. Bu durumda enzim kromojen solüsyonunu ürünlere dönüştüremeyeceğinden renk oluşmaz. Sonuçta örnekte AFM₁ varsa renk oluşmamakta, eğer örnekte AFM₁ yoksa renk oluşmaktadır.

2.2.5. Analiz İşlemi

1. Analiz edilecek örneklere ve standartlara yetecek sayıda mikrotiter kuyucukları mikrotiter taşıyıcılara yerleştirildi. Standart ve örnek pozisyonları not edildi. Analiz işlemleri ışıktan korunarak, diğer bir deyişle düşük ışık altında gerçekleştirildi.

2. Kuyucuklara analizi yapılacak örnek ya da standart solüsyonlarından 100 µl ilave edildi. Daha sonra pleyt (tabak) elle sallanarak karıştırıldı. Oda ısısında (20–25 °C) ve karanlıkta 60 dakika bekletildi.

3. Kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı. Absorban bir kâğıdın üzerine konarak sıvının tamamen emilmesi sağlandı. Kuyucuklara 250 µl yıkama solüsyonu ilave edildi. Sıvı tekrar boşaltıldı ve kurutuldu. Bu yıkama ve kurutma işlemi iki kez tekrarlandı.

4. Kuyucuklara 100 µl dilüe enzim konjugatı (antijen) ilave edildikten sonra pleyt elle ileri geri sallanarak karıştırıldı ve 60 dakika oda ısısında (20–25° C) karanlık ortamda bekletildi.

5. Kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı ve kuyucukların ağzı absorban kâğıda gelecek şekilde üç kez vuruldu, içindeki sıvının kağıt tarafından emilmesi sağlandı. Bu işlem yapılırken kâğıdın kuyucukların içerisine temas etmemesine özen

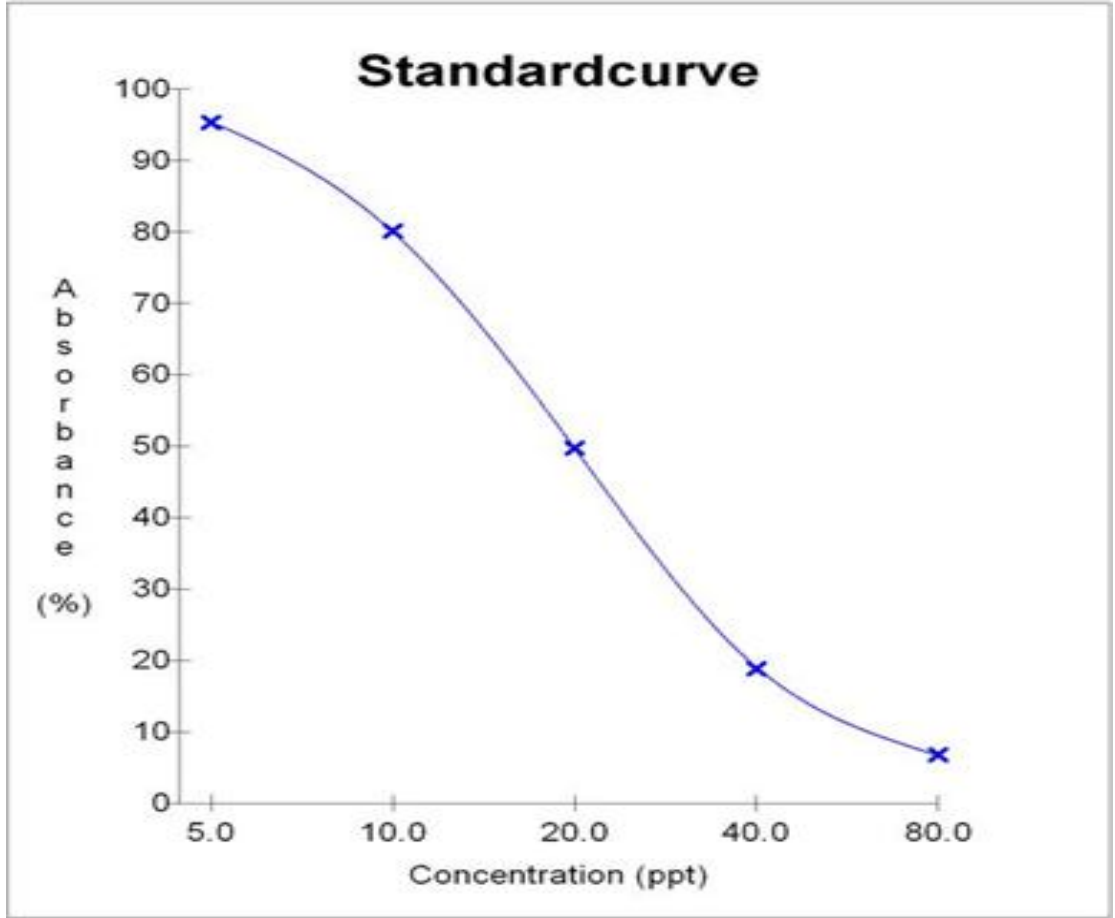
gösterildi. Kuyucuklara 250 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek sıvı boşaltıldı ve kurutuldu. Bu yıkama ve kurutma işlemi iki kez tekrarlandı.

6. Kuyucuklara 50 µl substrat ve 50 µl kromojen solüsyonları ilave edildi. Plaka elle ileri geri oynatılarak karıştırıldı. 30 dakika oda ısısında (20–25 °C) karanlıkta bekletildi.

7. Süre sonunda kuyucuklara 100 µl durdurma solüsyonu ilave edildi. Pleytler sallanarak elle karıştırıldı ve 450 nm dalga boyunda ELİSA okuyucusunda okundu. Okuma işlemi solüsyonunun ilave edilmesinden sonra 60 dakika içerisinde gerçekleştirildi.

Ardahan İli Merkez ve buna bağlı 5 ayrı ilçeden toplanan süt ve kaşar peyniri numunelerinde Aflatoksin M₁ düzeylerinin mevsimlere (sırasıyla yaz, sonbahar, kış, ilkbahar) göre belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, standart ve örneklerin ortalama absorbands değerlerinin hesaplamasında R-Biopharm tarafından hazırlanan bir bilgisayar programı olan Rıdavın.exe kullanıldı. Programa göre AFM₁'in standart eğrisi Şekil 2. 3' de gösterilmiştir. Standart absorbands oluşturuldu. Numunelerden elde edilen absorbands değerleri standart absorbands eğrisine göre değerlendirildi.

Süt ve peynir örneklerinde tespit edilen aflatoksin M₁ düzeyleri arasında farklılıkların mevsimlere göre önemli olup olmadığı, minitab 12.1 istatistik programı kullanılarak birgisayarda hesaplandı (92).



Şekil 2. 1: Aflatoksin M₁ Standart Eğrisi

3. BULGULAR

3.1. Yaz Dönemi Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerine Ait Analiz Sonuçları

Yaz mevsiminde (Temmuz ayında) Ardahan ili merkez ve buna bağlı 5 ayrı ilçede süt üreticilerinden rastgele alınan 60 adet süt örneği, AFM₁ yönünden analiz edilmiş olup, sonuçları Tablo 3. 1’de sunulmuştur. Tabloda görüldüğü gibi örneklerin hiçbirisinde ölçülebilir miktarlarda AFM₁ saptanamamıştır. Bu dönemde sığırlar merada otlatılmaktadır. Hayvanların beslenmesinde yem kullanılmamaktadır.

Tablo 3. 1: Yaz Dönemi Sütlerinde AFM₁ Düzeyleri

Yer	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Örneklerdeki Miktarın Dağılımı (ng/Kg)							Min.	Max.
			<5	5-10	11-25	26-50	51-80	>80			
Ardahan	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Çıldır	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Hanak	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Damal	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Posof	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Göle	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Toplam	60	0	60	-	-	-	-	-	-	-	

AB ve TGK de tolerans sınırı süt için 50 ng/kg’ dır.

Yine temmuz ayında yukarıda belirtilen yerlerde üreticilik yapan çiftçilerimizden o dönemdeki sütlerden elde edilen kaşar peynir numunelerinden toplam olarak 60 adedi AFM₁ yönünden analiz edilmiştir. Süt numunelerinde olduğu gibi hiçbir numunede ölçülebilir düzeylerde aflatoksine rastlanılmamıştır. AFM₁ analiz sonuçları Tablo 3. 2’de sunulmuştur.

Tablo 3. 2: Yaz Mevsimi Kaşar Peynirinde AFM₁ Düzeyleri

Yer	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Örneklerdeki Miktarın Dağılımı (ng/Kg)							Min.	Max
			<50	50-100	101-250	251-500	501-800	>800			
Ardahan	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Çıldır	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Hanak	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Damal	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Posof	10	0	10	-	-	-	-	-	-	-	
Göle	10	0	10	-	-	--	-	-	-	-	
Toplam	60	0	60	-	-	-	-	-	-	-	

AFM₁'in tolerans sınırı peynirlerde AB'de 250 ng/Kg, TKG'de 500 ng/kg'dır (150, 151).

Yaz mevsiminde üretilen süt ve kaşar peyniri örneklerinde AFM₁ düzeylerinin yüzde olarak değerlendirildiğinde analizi yapılan toplam 120 adet örneğin hiçbirisinde ölçülebilir düzeyde toksin % olarak (% 0) bulunmamaktadır. Veriler Tablo 3. 3'te sunulmuştur.

Tablo 3. 3: Yaz Mevsimine Ait Süt ve Kaşar Peyniri Örneklerinde AFM₁ Miktarının Dağılımı (%)

Yer	Bulunamayan (%)	Yasal Sınırın Altında (%)	Yasal Sınırın Üstünde (%)
Ardahan	100	-	-
Çıldır	100	-	-
Hanak	100	-	-
Damal	100	-	-
Posof	100	-	-
Göle	100	-	-
Toplam	100	-	-

3.2. Sonbahar Dönemi Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerine Ait Analiz Sonuçları

Sonbahar mevsiminde (Ekim ayında) yerleşim bazında 6 ayrı yerde üreticilik yapan toplam 60 çiftçiden rastgele alınan 60 adet süt numunesi, AFM₁ yönünden analiz edilmiş ve analiz sonuçları Tablo 3. 4' te sunulmuştur. Tabloda görüldüğü gibi 60 adet süt numunesinin sadece 4 tanesinde AFM₁ tespit edilmiştir. Tespit edilen toksin düzeyleri 6,4-19,4 ppt arasında değişmektedir. Bu miktarların hiçbirisinin Avrupa Birliği Ülkeleri ve Türk Gıda Kodeksi yasal sınırı olan 50 ng/L'yi aşmadığı görülmüştür. Ardahan ilinde ot ve tahıl hasatı sonbahara sarkmaktadır. Hasat ve depolanma esnasında ürünlerin yağmura maruz kaldığı görülmektedir. Sonbahar aylarında bu yörede beslenme amacıyla hayvanlara kısmen de olsa yem ve ot (ot yığınlarından) verilmektedir.

Tablo 3. 4: Sonbahar Dönemi Sütlerinde AFM₁ Düzeyleri

Yer	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Örneklerdeki Miktarın Dağılımı (ng/Kg)						Min.	Max.
			5-10	11-25	26-50	51-80	>80			
Ardahan	10	0	-	-	-	-	-	-	-	
Çıldır	10	0	-	-	-	-	-	-	-	
Hanak	10	0	-	-	-	-	-	-	-	
Damal	10	1	1	-	-	-	-	-	6.6	
Posof	10	1	-	1	-	-	-	-	19,4	
Göle	10	2	2	-	-	-	-	6,4	6.7	
Toplam	60	4	3	1	-	-	-			

Sonbahar döneminde elde edilen sütlerden yapılan 60 adet kaşar peyniri numunesine ait analiz sonuçları Tablo 3. 5'de sunulmuştur. Tabloda görüldüğü gibi 60 adet kaşar peyniri numunesinin 9 tanesinde AFM₁ tespit edilmiş ve pozitif örneklerin hiçbirinin Avrupa Birliği Ülkeleri ve Türkiye'de yasal tolerans sınırlarını (500 ng/Kg) aşmadığı görülmektedir. Bu mevsimde yapılan analizlerde kaşar peyniri

örneklerinde 65,2-178,3 ppt arasında AFM₁ bulunmuştur. Bu mevsimde yörede hayvanlar kısmen ot yığınları ve yemler ile beslenmektedir. Ayrıca sonbahar mevsiminde yağmurların arttığı da bilinmektedir.

Tablo 3. 5: Sonbahar Dönemi Kaşar peynirinde AFM₁ Düzeyleri

Yer	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Örneklerdeki Miktarın Dağılımı (ng/Kg)					Min.	Max.
			50-100	101-250	251-500	501-800	>800		
Ardahan	10	2	1	1	-	-	-	65.2	167.6
Çıldır	10	1	1		-	-	-	80.9	-
Hanak	10	1	1		-	-	-	74.2	-
Damal	10	2		2	-	-	-	128.1	133.7
Posof	10	2	1	1	-	-	-	69.4	178.3
Göle	10	1	1		-	-	-	83.1	-
Toplam	60	9	5	4	-	-	-		

Sonbahar dönemine ait süt ve kaşar peyniri numunelerinde bulunan AFM₁' in yüzde olarak miktarları Tablo 3. 6 ve 3. 7'de sunulmuştur.

Tablo 3. 6 ve Tablo 3. 7'den de anlaşıldığı gibi sonbahar mevsiminde analiz edilen süt örneklerinin % 6,6'sında, kaşar peyniri örneklerinin ise % 15'inde AFM₁ tespit edilmiş ve aflatoksin tespit edilen örneklerin tamamının yasal tolerans sınırlarının altında olduğu görülmektedir.

Tablo 3. 6: Sonbahar Mevsimine Ait Süt Örneklerinde AFM₁ Miktarının Yüzde Olarak Dağılımları

Yer	Bulunamayan (%)	Yasal Sınırın Altında (%)	Yasal Sınırın Üstünde (%)
Ardahan	100	-	-
Çıldır	100	-	-
Hanak	100	-	-
Damal	90	10	-
Posof	90	10	-
Göle	80	20	-
Toplam	93.4	6.6	-

Tablo 3. 7: Sonbahar Mevsimine Ait Kaşar Peyniri Örneklerinde AFM₁ Miktarının Yüzde Olarak Dağılımları

Yer	Bulunamayan (%)	Yasal Sınırın Altında (%)	Yasal Sınırın üstünde (%)
Ardahan	80	20	-
Çıldır	90	10	-
Hanak	90	10	-
Damal	80	20	-
Posof	80	20	-
Göle	90	10	-
Toplam	85	15	-

3.3. Kış Dönemi Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerine Ait Analiz Sonuçları

Ardahan il merkezi ve ilçelerinden Ocak ayında toplanan 60 adet süt numunesine ait AFM₁ analiz sonuçları Tablo 3. 8'de gösterilmektedir. Tabloda görüldüğü gibi analiz edilen toplam 60 adet süt örneğinin 28 adedinde AFM₁ tespit edilmiştir. Numunelerde AFM₁ değerleri 6,7-46,8 ppt arasında bulunmuştur. Tespit edilen 60 adet süt örneklerinin hiçbirinin AB ve TGK yasal tolerans sınırı olan 50 ng/L'yi aşmamış olduğu görülmektedir. Bu mevsimde elde edilen sütlerdeki AFM₁ miktarı yaz ve sonbahar mevsimlerine göre yüksek bulunmuştur. Kış mevsiminde Ardahan yöresinde sığırlar merada beslenmeyip, ahır şartlarında beslenmekte ve yaz mevsiminde elde edilen ot ve saman gibi yem maddeleri stoklanarak hayvanlara bu mevsimde verilmektedir. Stoklanan besinlerin küflenebileceği görülmektedir.

Tablo 3. 8: Kış Dönemi Sütlerinde AFM₁ Düzeyleri

Yer	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Örneklerdeki Miktarın Dağılımı (ng/Kg)					Min.	Max.
			5-10	11-25	26-50	51-80	>80		
Ardahan	10	5	2	1	2		-	7.5	46.8
Çıldır	10	6	2	2	2		-	7.2	42.4
Hanak	10	4	1	2	1	-	-	8.3	38.6
Damal	10	5	2	2	1	-	-	7.8	39.5
Posof	10	3	1	2	-	-	--	7.1	11.9
Göle	10	5	3	1	1	-	-	6.7	44.8
Toplam	60	28	11	10	5	-	-		

Kış mevsiminde Ardahan ilinin altı değişik yerleşim yerinden elde edilen toplam 60 kaşar peyniri örneklerinin analiz sonuçları Tablo 3. 9'da verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi 60 kaşar peyniri örneğinin 32 adedinde AFM₁ saptanmıştır. Numunelerdeki toksin miktarları 61,0-493,4 ppt arasında bulunmuştur. Analizi yapılan 60 adet numuneden pozitif olan 3 tanesinde aflatoksin miktarının 250

ng/Kg'ı aştığı görüldü. Pozitif numunelerdeki miktarın hiçbirinin AB ve TGK'da yasal sınır olan 500 ng/Kg ı aşmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 3. 9: Kış Dönemi Kaşar Peynirinde AFM₁ Düzeyleri

Yer	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Örneklerdeki Miktarının Dağılımı (ng/Kg)						
			50-100	101-250	251-500	501-800	>800	Min.	Max.
Ardahan	10	6	2	3	1	-	-	68,9	493.4
Çıldır	10	5	2	3	-	-	-	75.0	177.7
Hanak	10	6	2	3	1	-	-	69,2	379.5
Damal	10	5	3	2	-	-	-	61.0	200.5
Posof	10	6	4	2	-	-	-	66.9	203.5
Göle	10	4	2	1	1	-	-	74.2	379.5
Toplam	60	32	15	14	3	-	-		

Bu mevsimde süt ve kaşar peyniri örneklerinde bulunan AFM₁ düzeylerinin yüzdeleri Tablo 3.10. ve 3.11' de aşağıda sunulmuştur. Tablo 3.10'da görüldüğü gibi süt örneklerinin % 46,6'sında AFM₁ tespit edilmiş, tespit edilen bu miktarların hiçbirinin AB ve TGK yasal sınırını aşmamış olduğu görülmektedir. Tablo 3.11'de ise kaşar peyniri örneklerinde tespit edilen miktarlar % olarak sunulmuştur. Örneklerin % 53,3'ünde AFM₁ tespit edilmiştir. Peynirlerde tespit edilen miktarların AB ve TGK'da belirtilen tolerans sınırını aşmadığı görülmektedir.

Tablo 3. 10: Kış Mevsimine ait Süt Örneklerinde AFM₁ Miktarlarının % Dağılımı (AB ve TGK göre)

Yer	Bulunamayan (%)	Yasal Sınırın Altında (%)	Yasal Sınırın Üstünde (%)
Ardahan	50	50	-
Çıldır	40	60	-
Hanak	60	40	-
Damal	50	50	-
Posof	70	30	-
Göle	50	50	-
Toplam	46,6	53,3	-

Tablo 3. 11: Kış Mevsimine Ait Kaşar Peyniri Örneklerinde AFM₁ Miktarlarının % Dağılımı

Yer	Bulunamayan (%)	Yasal Sınırın Altında (%)	Yasal Sınırı Aşan (%)
Ardahan	40	60	-
Çıldır	50	50	-
Hanak	40	60	-
Damal	50	50	-
Posof	40	60	-
Göle	60	40	-
Toplam	46.7	53.3	-

3.4. İlkbahar Dönemi Toplanan Süt ve Kaşar Peynirlerine ait Analiz Sonuçları

İlkbahar mevsiminde (Nisan ayında) Ardahan İl Merkez ve buna bağlı 5 ilçede üreticilik yapan çiftçilerden rastgele alınan süt örneklerinde yapılan AFM₁ analiz sonuçları Tablo 3. 12’de verilmiştir. Tablodan da anlaşılacağı gibi toplam analiz edilen 60 adet süt numunesinin 34 adedinde AFM₁ tespit edilmiştir. Tespit

edilen toksin miktarları 11,5-47,8 ng/L arasında değişmektedir. Süt numunelerinin 34 adedinde toksin bulunmuş olup, miktarın AB ve TGK'de belirlenen tolerans sınırını (50 ng/L) aşmadığı görülmektedir.

Tablo 3.12: İlkbahar Dönemi Sütlerinde AFM₁ Düzeyleri

Yer	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Örneklerdeki Miktarın Dağılımı (ng/Kg)						
			5-10	11-25	26-50	51-80	>80	Min.	Max.
Ardahan	10	4	-	-	4		-	35.3	47.4
Çıldır	10	6	-	1	7		-	13.2	44.6
Hanak	10	7	-	2	5		-	11.5	40.4
Damal	10	6	-	1	5		-	14.9	42.0
Posof	10	5	-	2	3		-	11.9	45.0
Göle	10	6	-	1	5		-	12.8	47.8
Toplam	60	34	-	7	27		-		

İlkbahar mevsiminde elde edilen sütlerden yapılan toplam 60 adet kaşar peyniri örneklerinin 37 adedinde AFM₁ tespit edilmiştir (Tablo 3.13). Tespit edilen AFM₁ miktarları 61,9-483,3 ppt arasındadır. Pozitif örneklerin hiçbirinin AB ve TGK'da bildirilen yasal tolerans sınırını (500 ng/Kg) aşmadığı görülmektedir (151).

Tablo 3.13: İlkbahar Dönemi Kaşar Peynirinde AFM₁ Düzeyleri

Yer	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Örneklerdeki Miktarların Dağılımı (ng/Kg)						
			50-100	101-250	251-500	501-800	>800	Min.	Max.
Ardahan	10	6	1	3	2		-	68.6	483.3
Çıldır	10	7	2	4	1	-	-	73.0	370.3
Hanak	10	6	1	4	1	-	-	83.9	377.8
Damal	10	5	2	3	-	-	-	61.9	144.0
Posof	10	7	2	4	1	-	-	68.4	279.1
Göle	10	6	1	3	2	-	-	78.2	265.5
Toplam	60	37	9	21	7		-		

Tablo 3.14'den de anlaşılacağı üzere İlkbahar döneminde alınan toplam süt numunelerinin % 56,6'sında AFM₁ tespit edilmiştir. Alınan süt örneklerinde tespit edilen değerlerin AB ve TGK'de belirtilen tolerans sınırını aşmadığı görülmektedir.

Tablo 3.15'te görüldüğü gibi ilkbahar mevsiminde analiz edilen kaşar peyniri örneklerinin % 61,66'sında AFM₁ tespit edilmiştir. Analiz edilen 60 numuneden pozitif olanlar arasında tespit edilen düzeylerin hiçbirinin AB ve TGK tarafından belirlenen yasal sınır olan 500 ng/Kg'ı aşmamış olduğu tespit edilmiştir (151).

Tablo 3. 14: İlkbahar Mevsimine ait Süt Örneklerinde AFM₁ Miktarlarının % Dağılımı

Yer	Bulunamayan (%)	Yasal Sınırın Altında (%)	Yasal Sınırı Aşan (%)
Ardahan	60	40	-
Çıldır	40	60	-
Hanak	30	70	-
Damal	40	60	-
Posof	50	50	-
Göle	40	60	-
Toplam	43.4	56.6	-

Tablo 3. 15: İlkbahar Mevsimine Ait Kaşar Peyniri Örneklerinde AFM₁ Miktarının % Dağılımı (AB ülkelerine göre)

Yer	Bulunamayan (%)	Yasal Sınırın Altında (%)	Yasal Sınırın üstünde (%)
Ardahan	40	60	-
Çıldır	30	70	-
Hanak	40	60	-
Damal	50	50	-
Posof	30	70	-
Göle	40	60	-
Toplam	38.3	61,66	-

Yukarıdaki verilerden de anlaşıldığı gibi mevsimlere göre analizi yapılan süt ve kaşar peynir örneklerinde yaz mevsiminde AFM₁ hiç tespit edilemezken, en fazla İlkbahar olmak üzere sonbahar ve kış mevsimlerinde değişik seviyelerde AFM₁ tespit edilmiştir. Mevsimlere göre bu farklılıkların önemli olup olmadığı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 3.16).

Tablo 3. 16: AFM₁ Tespit Edilen Süt ve Peynir Numune Sayılarının Mevsimlere Göre Karşılaştırılması

Mevsimler	Pozitif Süt Örneği Sayısı	Pozitif Peynir Örn. Sayısı
Yaz	0 ^c	0 ^c
Sonbahar	4 ^b	9 ^b
Kış	28 ^a	32 ^a
İlkbahar	34 ^a	37 ^a

$P \leq 0,05$ aralığında aynı sütündeki farklı harf taşıyanlar, taşımayanlara göre istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Aflatoksinler *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* gibi mantarların gıda, yem ve yem hammaddelerinde ürediklerinde salgıladıkları toksik metabolitlerdir. Mantarların üremeleri ve sonuçta toksin sentezleyebilmeleri için bulaştığı bir gıda maddesinin yanı sıra uygun rutubet ve ısı oranının da bulunması şarttır. Aflatoksin sentezleyen mantarlar bütün tahıl ürünlerinde uygun nem, ısı ve oksijen oranı bulduklarında hızla üreyerek toksin sentezleyebilirler. Bu ürünlerin herhangi bir evrensinde olabilir (tarla, hasat, depolanma gibi). Yemler hayvan beslemede yaygın kullanıldığı için aflatoksin kirlilikleri hayvan ve insan sağlığı açısından büyük bir önem arz etmektedir. Aflatoksin B₁, B₂, G₁,G₂ ile B₁ ve B₂'nin metaboliti olan M₁ ve M₂ süte geçebilirler. Yumurta ve et gibi hayvansal ürünlerde de bulunabilirler. Ayrıca kontamine hayvansal ürünler ile hazırlanan diğer besin maddelerine ulaşarak tüketicilerin sağlığını olumsuz yönde etkilerler. Süt ve süt ürünlerinde AFM₁ varlığının nedenini, laktasyon periyodunda olan ineklerin Aflatoksin B₁ içeren yem ve yem maddeleri ile beslenmesi oluşturur. Bulaşık yem ve diğer gıda maddeleriyle alınan aflatoksinler karaciğerde biyotransformasyona uğrayarak AFM₁ metabolitine dönüşür. Bu metabolit meme bezlerinden süte geçebilmektedir. Ayrıca sütte az da olsa ana metabolitler de bulunmaktadır. Süt insanlar açısından değerli bir besin maddesi olup, fazla miktarda tüketilmektedir. Süt ve süt ürünlerinin daha çok bebekler ve çocuklar tarafından tüketilmesi ayrı bir sorun doğurmaktadır. Çünkü gelişme çağında olan bu canlılar toksinlerden daha kolay etkilenmektedir. Emzirme döneminde olan anneler, bulaşık sütlerle beslendiklerinde toksinleri sütleriyle yavrularına aktarırlar. Yine iyileşme dönemindeki hastalar kontamine süt ile beslendiklerinde vücutlarına ekstrasdan bir zehiri daha almış olurlar. Bu olumsuz durum aflatoksinli sütlerden hazırlanan ürünlerin tüketilmesinde de görülebilir. Çünkü AFM₁ sütle atıldığı için peynir, yoğurt, süt tozu, tereyağı gibi süt ürünlerinde bulunabilmektedir. Bu nedenle aflatoksinle bulaşık sütler insan sağlığı açısından önemli bir risk teşkil etmektedir. Böyle ürünleri tüketen insanların immun sistemi baskılanmaktadır. Aflatoksin özellikle karaciğer kanseri oluşumuna yol

açabilmektedir. Ayrıca AFM₁'in genotoksik ve mutajenik etkileri de bulunabilmektedir (53, 97, 162).

Ardahan İli'nin başlıca geçim kaynağı hayvancılık olup süt ve kaşar peyniri önemli ölçüde üretilmektedir. Ardahan'da üretilen bu ürünler hem yörede hem de ülkemizin diğer bölgelerinde tüketilmektedir. Bu nedenle yörede üretilen süt ve süt ürünlerindeki Aflatoksin miktarlarının bilinmesi sağlık açısından büyük bir önem arz etmektedir.

Süt ve süt ürünlerinde AFM₁'in belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin başında İTK, HPLC (YBSK) ve ELISA gelmektedir. Bu yöntemler arasında ELISA, duyarlılığının yüksek olması, kullanımının kolay ve çok sayıda numunenin kısa sürede analizine imkan vermesi nedeniyle aflatoksin analizinde oldukça yaygın kullanılmaktadır (43, 97, 126). Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada AFM₁ analizi için ELISA yönteminden faydalanılmıştır. Ancak ELISA yönteminin dezavantajları da bulunmaktadır. Bu olumsuz durumun başında aflatoksin türevleri arasında kimyasal benzerlikten dolayı çapraz reaksiyonların ortaya çıkmasıdır. Bu nedenle elde edilen sonuçlar her ne kadar yüksek bir olasılıkla Aflatoksin M₁'i gösteriyorsa da az da olsa diğer türevlerin bunda bir rolü olabileceği şüphesini de taşımaktadır. Bu nedenle genelde immünokimyasal testler diğer yöntemler ile de doğrulanmalıdır. Bu çalışma genel bir tarama niteliğinde olup elde edilen sonuçlar aflatoksin varlığının ortaya konmasına hizmet edecektir. Bu nedenle bu yanılgılar göz önüne alınmakla birlikte amaca ulaşmada bir engel olarak değerlendirilmemiştir. Yöntem yüksek standartlarda olup, rutin olarak analizlerde kullanılmaktadır.

Bugün dünyada hemen hemen tüm ülkelerde sütte AFM₁'in toksik etkilerinden kaçınabilmek için hayvan yemleri, insan gıdaları, süt ve süt ürünleri için belirlenmiş tolerans limitleri bulunmaktadır. Bu tolerans limiti süt için Türkiye'de 50 ng/L olarak belirlenmiştir (7). Aflatoksikozisten korunmak ve gerekli tedbirleri almak için süt, süt ürünleri ve yemlerde rutin analizler yapılmalıdır. Belirlenen yasal tolerans sınırını aşan yem ve gıdaların kullanılmasına izin verilmemelidir. Günümüzde aflatoksinlerin yem, süt ve süt ürünlerindeki kontrolü Avrupa'da ve gelişmiş birçok ülkede sistematik bir şekilde yapılmaktadır. Türkiye'de bu konuda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Bu çalışmayla Ardahan yöresinde üretilen süt ve kaşar peynirlerinde AFM₁ düzeyleri ve bu düzeylerin mevsimlere bağlı olarak değişiklik gösterip, göstermedikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, yörede üretilen süt ve peynirlerde AFM₁ kirliliğinin tespitine hizmet edeceği düşünülmektedir. Araştırma sonucu tespit edilen aflatoksin kirliliğinin zehirlenme açısından bir risk oluşturup oluşturmadığını ortaya çıkaracaktır. Elde edilen sonuçlar aynı zamanda diğer çalışmalara da bilimsel anlamda bir destek olacaktır. Ayrıca kirliliğe karşı gereken tedbirlerin alınmasına ışık tutacaktır.

Bu araştırmada ELISA yöntemi ile analizi yapılan 240 adet süt örneğinde AFM₁ düzeyi ortalama olarak 11,5 ppt; 240 adet kaşar peyniri örneğinde ise ortalama olarak 79,2 ppt şeklinde tespit edildi. Bu ortalama düzeylerin AB Ülkeleri ve Türkiyede belirlenen yasal tolerans limitlerinin çok altında olduğu görülmektedir. Analiz edilen süt numuneleri arasında AFM₁ rastlanma oranı % 27,5, kaşar peyniri numunelerinde % 32,5 olarak belirlenmiştir. Bu ortalama oranların taranan çalışmalarda görülen oranların çok altında olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada analizi yapılan süt ve kaşar peyniri numunelerinde tespit edilen ortalama AFM₁ düzeyleri mevsimlere göre aşağıda sunulmuştur. Yaz mevsiminde toplanan süt ve kaşar peyniri örneklerinde ölçülebilir oran olan 5 ppt'nin altında AFM₁ belirlenmiştir (bu düzeyin altındaki miktarlar yok olarak kabul edilmiştir). Sonbahar mevsiminde toplanan süt örneklerinde AFM₁ 8,6 ppt, kaşar peynirinde 81,1 ppt, Kış mevsiminde alınan sütlerde ortalama 11,6 ppt, kaşar peynirinde 100,3 ppt ve İlkbahar mevsiminde toplanan süt örneklerinde 25,2 ppt, kaşar peynirinde ise 122,8 ppt olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen bu ortalama düzeylerin hepsi AB ülkeleri ve Türkiye'de izin verilen limitlerin altında kalmaktadır.

Numunelerin toplandığı merkezlere göre ise AFM₁ miktarları homojen bir dağılım gösterdiği, aralarında önemli farklılıkların olmadığı görülmüştür. Bu hem süt hem de kaşar peyniri numuneleri için geçerlidir. Ancak mevsimlere göre bulunan miktarlar karşılaştırıldığında kış ve ilkbahar mevsiminde diğer mevsimlere göre daha yüksek düzeyde aflatoksin tespit edilmiştir. Bu farklılığın istatistiksel yönden önemli olduğu belirlenmiştir. Bu durum hem süt hem de peynir numuneleri için geçerlidir.

Dünyada ve Türkiye'de süt ve süt ürünlerinde aflatoksin düzeyleriyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Yaroğlu ve ark. (162) Ocak 2001-Şubat 2002

tarihleri arasında Bursa' daki askeri birliklere alınan ve Türkiye'nin değişik illerinden getirilen 200 adet beyaz peyniri, 200 adet kaşar peyniri ve 200 adet işlenmiş peynir olmak üzere toplam 600 numuneyi AFM₁ yönünden incelemiş ve 600 numunenin 30 adedinde (% 5 oranında) toksin saptamışlardır. Bu araştırmacılar 200 adet kaşar peyniri numunesinin 12 adedinde (% 6 oranında) AFM₁ kalıntısı tespit etmiş ve bunlardan 2 adet numunede (% 1) bulunan düzeylerin AB Ülkelerinin belirlemiş olduğu yasal tolerans sınırı aşmış olduğunu belirlemişlerdir.

Oruç ve ark. (99) Bursa İli'nin ova ve dağ köylerinden topladığı 115 adet çiğ süt numunelerinde yaptığı analizler sonucu oldukça yüksek, neredeyse tama yakın bir oranda (% 99,13) AFM₁ belirlemişlerdir. Analiz ettikleri numunelerin yaklaşık % 60'ının AB ve Türkiye'de kabul edilmiş tolerans limiti olan 50 ng/L'yi aştığını, ancak numunelerden hiçbirinde tespit edilen AFM₁ miktarının Codex Alimentarius'da geçen (2001) tolerans limitini (500 ng/L'yi) aşmadığını tespit etmişlerdir.

Süt ve süt ürünlerindeki AFM₁ miktarlarının yapılan araştırmalarda ülkelere ve coğrafi konumlarına göre büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. ABD'de 1979-1988 yılları arasında peynir, dondurma, yoğurt ve yağsız kuru krema örneklerinden aflatoksin düzeyleri araştırılmıştır. Alınan örneklerden sadece peynirde % 0,4 oranında AFM₁ bulunmuştur. Aynı yıllarda Hollanda'da yapılan çalışmada peynir numunelerinin % 85,5'unda, süt numunelerinin ise % 80'inde AFM₁'e rastlanmıştır (98). Görüldüğü üzere Hollanda'da daha yüksek oranda toksin tespit edilmiştir. Bu durum yetiştiricilik ve mevsimsel şartlar ile açıklanabilir.

Hussain ve ark. (68) Pakistan'da yaptıkları çalışmada bufalo, sığır, keçi, koyun ve deve sütlerinden oluşan toplam 169 süt örneğini YBSK (HPLC) metodu ile AFM₁ yönünden araştırmış ve 40 adet sığır sütü numunesinin 15 (% 37,5)'inde toksin tespit ettiklerini ve bu sonuçlardan 3 adet (% 20) süt örneğindeki miktarın AB ülkelerinde kabul edilen tolerans sınırını aştığını bildirmişlerdir. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar Hussain ve ark. tarafından elde edilen sonuçlar ile kısmen bir benzerlik göstermektedir.

Keskin ve ark. (75) tarafından İstanbul İli'nde yapılan bir çalışmada 60 adet sığır sütü kullanılmış, analiz edilen örneklerin 20 (% 33,3) tanesinde AFM₁ (ortalama değerleri 5,40-300,20 ng/L) pozitif bulunmuştur. Bu pozitif örneklerin 5 tanesinin

(61,20-300,20 ng/L) tolerans sınırını aştığını rapor etmişlerdir. Ardahan İli'nde yapılan bu çalışmadan da yaklaşık benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu çalışmada Ardahan yöresinde süt numunelerinde tespit edilen miktarların hiçbirisinin tolerans limitlerini aşmadığı görülmüştür. Elde edilen sonuçların benzer olması yöresel yakınlığa ve hayvanların benzer yetiştirilme şartlarında bulunmalarına bağlanabilir.

Oruç ve Sonal (98) Bursa'da süpermarket, mandıra ve sokak sütçülerinden toplanan tam ve yarım yağlı beyaz peynir, taze ve eski kaşar, beyaz peynir lorlu, tulum peyniri, mihaliç, Şanlıurfa ve Van otlu peynirinden oluşan 57 adet peynir numunesinde AFM₁'in bulunma oranını oldukça yüksek (% 89,47) bulmuşlardır. Süt numunelerinde ise (10 adet) aflatoxin bulunma oranının düşük olduğunu (% 10) tespit etmişlerdir. Analiz ettikleri peynirlerin % 12,28 inde AFM₁ miktarının AB ve TGK'nde geçen tolerans limit olan (150) 250 ng/kg'ın üzerinde olduğunu belirtmişlerdir.

Tekinşen ve Eken (146) İstanbul, İzmir, Konya, Tekirdağ ve Edirne İlleri'nde perakende satış yerlerinden topladıkları 100 adet UHT süt ve 132 kaşar peyniri örneklerini ELISA yöntemiyle AFM₁ yönünden incelemiş ve kaşar peyniri numunelerinin % 82,6'sında ve süt numunelerinin ise 67 adedinde AFM₁ bulmuşlardır. Bulunan değerlerin süt ve kaşar peynir numunelerinde sırasıyla 10-630 ng/kg ve 50-690 ng/kg arasında olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların elde ettiği sonuçlara göre 100 adet süt numunesinin 31'inde (% 31) ve kaşar numunelerinin ise 36'sında (% 27,3) AB ve TGK'nde (150) geçen limiti aştığı görülmektedir.

Gündinç ve Filazi (60) Bursa yöresinde süpermarketlerde satılan tam yağlı 50 UHT süt numunelerini ELISA yöntemiyle incelemiş, farklı düzeylerde olmak üzere tüm numunelerde (% 100) AFM₁ belirlenmiş ve 10 numunenin (% 20) AB ve TGK'da geçen tolerans limitinin üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Unusan (153) Türkiyenin Orta Anadolu Bölgesi'nden (Konya, Ankara, Sivas, Kayseri ve Niğde illeri) Ocak-Şubat 2005 tarihleri arasında toplanan 129 adet UHT süt örneklerinde AFM₁ varlığını ELISA yöntemiyle araştırmıştır. Araştırmacı yaptığı bu çalışmada 75 örneğin (% 58,1) AFM₁ ile kontamine olduğunu, tespit edilen AFM₁ miktarının toplam numunenin 68 (% 53)'inde Avrupa Ülkelerinin belirlediği tolerans sınırının altında, 61 örnekte (% 47) ise üzerinde olduğunu rapor etmiştir. Yapılan

analiz sonucunda elde edilen verilere göre toplam numune içerisinde yalnızca 4 adet numunede bulunan AFM₁ miktarının ABD'nin belirlediği tolerans sınırı aştığını bildirmiştir.

Atasever ve ark. (8) Erzurum yöresinde, 500 süt ve süt ürünlerinde ELISA metodu ile yaptıkları çalışmada 388 (% 77,6) örnekte yüksek oranda AFM₁ bulunduğunu rapor etmişlerdir. Yine Atasever ve ark. (6) Erzurum İli'nde tüketime sunulan 85 beyaz peynir, 75 kaşar peynir, 62 civil peynir ve 82 krem peynir olmak üzere toplam 304 peynir numunesinde ELISA metoduyla yaptıkları araştırmada, kaşar peynir numunelerinin % 80'inde AFM₁ tespit ettiklerini ve bu örneklerin % 34,7'sinin AB ülkelerinde geçerli olan tolerans sınırını (250 ng/Kg) ve % 14,7'sinin ise TGK'da belirlenen tolerans sınırını (500 ng/Kg) aştığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada pozitif bulunan peynir örneklerinde AFM₁ düzeyleri en düşük 51 ng/Kg en yüksek ise 860 ng/Kg aralığında tespit edilmiştir.

Atasever ve ark. (7) tarafından yapılan diğer bir araştırma ise yine Erzurum İli'nde yapılmıştır. Erzurum İlinde faaliyet gösteren marketlerden toplanan 150 adet UHT süt örnekleri aflatoksin yönünden analiz edilmiştir. Bu çalışmada ELISA yöntemi kullanılmış olup 150 adet süt örneklerinin % 59 unda AFM₁ belirlenmiştir. Araştırmacılar 16 numunenin (% 10,7) TGK ve AB tarafından belirlenen tolerans limitini aştığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada AFM₁ miktarlarını 5-185 ng/Kg arasında bulmuşlardır.

Gürbay ve ark. (61) Ankara ilinden topladıkları 24 adet UHT ve 3 adet pastörize olmak üzere toplam 27 adet süt numunesinde YBSK yöntemiyle yaptıkları AFM₁ analizi sonucunda toplam örneklerin % 59,3'ünde AFM₁ tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aflatoksin tespit ettikleri örneklerin sadece birinin (% 3,7) AB ve TGK'nde belirlenen yasal limit olan 50 ng/L'yi aştığını bildirmişlerdir.

Ayçiçek ve ark. (9) Eylül 2002-Eylül 2003 yılları arasında Ankara'da marketlerde satışa sunulan 94 beyaz peynir, 49 krem peynir, 53 kaşar peyniri, 27 tereyağı olmak üzere toplam 223 adet süt ürünü ELISA yöntemi kullanılarak AFM₁ yönünden analiz etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda 202 numunede (% 90.58) AFM₁ tespit edildiğini 21 adet numunede ise (% 9.42) tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 53 adet kaşar peynir numunesinin 47 (% 88.68)'sinde AFM₁ tespit edilmiş ve bu numunelerin 7'sinin (% 13,2) AB Ülkeleri

için geçerli tolerans sınır olan 250 ng/Kg'ı aştığını bildirmişlerdir. Araştırmada sütlerde AFM₁ yaygınlığı özellikle dikkati çekmektedir. Bu araştırmada elde edilen sonuçların Ayçiçek ve ark. (9) elde ettikleri sonuçlardan çok daha düşük olduğu söylenebilir.

Sarımehmetoğlu ve ark. (126) Ankara İli'nde değişik marketlerden topladıkları 100'er adet beyaz, tulum, kaşar ve işlenmiş peynir olmak üzere toplam 400 peynir numunesinde AFM₁ varlığının ve düzeyinin tespitine ilişkin yaptıkları araştırma sonucunda 73 örnekte (% 18,25) AFM₁ bulunmamasına karşın, 327 örnekte (% 81,75) önemli düzeylerde toksin tespit etmişlerdir. Analizi yapılan peynir numunelerinden 110 (% 27,5) tanesinin TGK sınırı olan 250 ng/Kg'yi (150) aştığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada AFM₁ miktarının peynir numuneleri içerisinde % 85 oranla en fazla kaşar peynirde bulunduğunu ve bununla % 34' ünün TGK'da (2002 Tebliğine göre, 150) belirlenen yasal limiti aştığını bildirmişlerdir. Ankara İli'nde süt ve peynirlerin AFM₁ açısından yaygın olarak kirli olduğu söylenebilir.

Kireççi ve ark. (78) Sarıkamış yöresinde tüketime sunulan süt ve peynir ürünlerinde AFM₁ varlığının belirlenmesine yönelik ELİSA ile yaptıkları araştırmada incelenen toplam 80 süt ve peynir örneğinin 68'inde (% 85) AFM₁ saptanmış ve örneklerin 30 (% 37,5)'unda ise AFM₁ miktarının TGK'nin 2002 tarihli tebliğine göre kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğunu belirtmişlerdir.

Aksoy ve ark. (2) Samsun çevresinde tüketime sunulan 36 çiğ süt, 25 beyaz ve 25 kaşar olmak üzere toplam 50 peynir ve 50 adet fındık örneklerinde ELİSA yöntemiyle aflatoxin belirlenmesine yönelik yapmış oldukları çalışmada çiğ sütte % 61, beyaz peynirde % 12 ve kaşar peynirde ise % 80 oranında toksin tespit etmelerine rağmen, numunelerde tespit edilen miktarların hiçbirinin tolerans sınırını aşmadıklarını rapor etmişlerdir.

Süt ve süt ürünlerinde bulunan AFM₁'in başta bebek ve çocuklar olmak üzere bu tür besinleri tüketen insanlarda ciddi sağlık sorunu oluşturduğu bilinmektedir. Bu nedenle süt ve süt ürünlerinde AFM₁'in tespitine yönelik Dünyada ve Türkiye'de pek çok araştırma yapılmış olduğu görülmektedir. Süt numunelerinde AFM₁ tespiti ile ilgili çok sayıda araştırmaya rastlanılmaktadır. Oruç ve ark. (99) % 99,13, Tekinşen ve Eken (146) % 67, Unusan (153) % 58,1, Atasever ve ark. (8) % 77,6, Gürbay ve ark. (61) % 59,3, Bakırcı (12) % 87,77, Kireççi ve ark. (77) % 85, Aksoy ve ark. (2)

% 61, Gündinç ve Filazi (60) % 100 ve Hussain ve ark. (68) % 37,5 oranlarında sütte AFM₁ tespit etmişlerdir. Ardahan yöresinde yapılan bu araştırmada toplam 240 adet süt numunesinin % 27,5'inde AFM₁ tespit edilmiştir. Bu oranın diğer araştırmacıların buldukları miktarlardan daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca tespit edilen miktarların tolerans sınırının altında kaldığı görülmektedir. Tespit edilen miktarların Gürbay ve ark. (61) dahil, diğer bahsi geçen araştırmacıların bulmuş oldukları oranlardan çok düşük olduğu anlaşılmaktadır.

Yaroğlu ve ark.(162) Kaşar peynir örneklerinde AFM₁ miktarını düşük düzeyde (% 6) tespit etmelerine rağmen, diğer bazı araştırmacılar Oruç ve Sonal (98) % 89,47, Tekinşen ve Eken (146) % 82,6, Atasever ve ark (6). % 80, Ayçiçek ve ark. (9) % 88,68, Sarımeahmetoğlu ve ark. (126) % 85, Aksoy ve ark.(2) % 80 gibi çok yüksek miktarlarda tespit etmişlerdir. Bu çalışmada analiz edilen toplam 240 adet kaşar peyniri numunesinde tespit edilen AFM₁ oranı (% 32,5) Yaroğlu ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlardan yüksek, ancak diğer araştırmacıların buldukları değerlerden ise düşük bulunmuştur. Bu çalışmada toplamda süt ve kaşar peyniri örneklerinde sırasıyla % 27,5 ile % 32,5 oranında AFM₁ tespit edilmiştir. Tespit edilen aflatoksin miktarları süt örneklerinde 6,4-47,8 ppt, kaşar peyniri örneklerinde ise 61,0-483,3 ppt arasında bulunmuştur. AFM₁ tespit edilen süt örneklerindeki miktarların hiçbir mevsimde AB ve TGK'da belirtilen tolerans sınırını aşmadığı görülmektedir. Kaşar peynir örneklerinde tespit edilen miktarların sütlerde olduğu gibi TGK'da AFM₁ için belirlenmiş tolerans sınırını aşmadığı görülmüştür.

Aflatoksin M₁ sütte bulunan kazein proteinine ilgi gösterdiğinden oransal olarak süttten daha fazla miktarlarda peynirlerde tespit edilmektedir (12). Bu sebeple eğer peynirler AFM₁ taşıyan sütlerden hazırlanırsa süt ürünleri arasında en güçlü aflatoksin kaynağı olarak düşünülebilir. Burada aflatoksinlerin ısıya karşı dayanıklı olmaları da önemli bir rol oynamaktadır. Bu araştırma sonucunda süt ve kaşar peyniri örneklerinde toplamda birbirine yakın oranda toksin tespit edilmiştir. Kaşar peynirinde ortalama miktarların ise sütte göre yüksek bulunması yaklaşık 5-10 L süttten bir Kg kaşar elde edilmesine bağlanabilir. Yani kaşar daha yoğun protein ve yağ içermektedir. Bu nedenle süttten daha fazla aflatoksin taşınması doğaldır.

Ardahan yöresinde üretilen süt ve kaşar peyniri örneklerinin AFM₁ içeriği bu çalışma sonuçlarına göre mevsimsel olarak karşılaştırıldığında yaz mevsiminde hiç

AFM₁ tespit edilemezken sonbahar ve kış mevsimlerinde değişik düzeylerde aflatoksin tespit edilmiş olup, en yüksek miktara ise ilkbahar mevsiminde rastlanmıştır. Mevsimsel farklılık istatistiksel yönden önemli bulunmuştur. Bu çalışmada AFM₁ miktarına süt numunelerinde en düşük 6,4 ng/Kg ile sonbahar mevsiminde, en yüksek 47,8 ng/Kg düzey itibari ile de ilkbahar mevsiminde tespit edilmiştir. Kaşar peynir numunelerinde de sütte olduğu gibi en yüksek AFM₁ miktarına (483,3 ng/Kg olarak) İlkbahar mevsiminde rastlanmıştır.

Bu araştırma sonuçları mevsimsel olarak değerlendirildiğinde süt ve kaşar peynirlerinde AFM₁ miktarı en fazla ilkbahar mevsiminde görülmektedir. Bu çalışmada ilkbaharda toplanan süt numunelerinin % 56,6'sı, kaşar peynirlerinin ise % 61,7'sinde aflatoksin belirlenmiştir. Bu mevsimde aflatoksin tespit edilen süt numunelerindeki miktarların AB ve TGK'nın belirlediği tolerans sınırını aşmadığı görülmüştür. Benzer durum aflatoksin bulunmuş kaşar peynir numuneleri için de geçerlidir. Numunelerdeki miktarın hiçbirinin TGK'da belirlenen (500 ng/Kg'a göre) tolerans sınırları aşmadığı tespit edilmiştir.

İlkbahar aylarında havaların ısınmaya başlaması ve rutubetin artması sonucunda AFM₁ üreten küflerin gelişimi ve toksin sentezlemeye başladıkları doğaldır. Bu bilgiler ile araştırma sonuçlarının paralellik arz ettiği görülmektedir. Ardahan İli'nde ve ilçelerinde hayvan beslemede ot yığınları kullanılmaktadır. Nem ve sıcaklığın artmasıyla birlikte kontamine yığınlarda ilkbahar aylarında AFB₁ kontaminasyonu olasılığı artmaktadır. Kontamine gıda maddelerinin tüketilmesi sonucu sütlerde AFM₁ düzeyleri artar. Sonuçta süt ve süt ürünlerinin kirlenmesi kaçınılmaz olmaktadır. Ancak üretilen süt miktarının bu mevsimde yörede az olması insanların sağlığı açısından bir avantaj olarak ele alınabilir. Bu mevsimde elde edilen sütler daha çok yavruların beslenmesinde kullanılmaktadır. İnsan sağlığı açısından olumlu olarak değerlendirilen bu durum, hayvan yavruları açısından bir olumsuzluk faktörüdür. Böyle sütlerle beslenen yavruların gelişmesi olumsuz etkilenebilir. İnsan besini amacıyla bu yörede elde edilen sütler daha çok Haziran ayı başından sonra kullanılmaktadır (tamamına yakını peynir olarak). Sonbahar aylarında ise hayvanlar genelde kuru döneme girmektedir. Bu durum ve elde edilen bulgular değerlendirildiğinde yöredeki süt ve süt ürünlerinin aflatoksin kirliliği ve sağlık açısından daha güvenli olduğu söylenebilir.

Bu çalışmaya benzer sonuçlar diğer bazı araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir. Fallah (50) İran'ın dört büyük şehrinde süpermarketlerde satışı sunulan süt, yoğurt, beyaz peynir, tereyağı ve dondurmaya İTK metoduyla AFM₁ yönünden incelemiş ve kış mevsiminde elde edilen süt ve süt ürünlerindeki AFM₁ miktarının yaz mevsimine göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bunu doğrulayan diğer bir araştırma Kamkar (71) İran'da yapmış ve 111 çiğ süt örneklerinin 85 adetinde (% 76,5) AFM₁ tespit etmiştir. Tespit edilen örneklerdeki AFM₁ düzeylerinin % 40'ının AB'nin belirlediği yasal tolerans sınırı aştığını açıklamıştır. Aynı çalışmada ortalama 0,024 ppb ile AFM₁ miktarı en düşük Ağustos ayında, 0,118 ppb ortalama ile de en yüksek Aralık ayında bulunmuştur. Bu bulgularla paralellik gösteren benzer araştırmaları Blanco ve ark. (19), Lopez ve ark. (85), Sugiyama ve ark. (138) ve Tajkarimi ve ark. (143) da yapmışlardır. Bu araştırmacılar kış mevsiminde elde edilen süt ve süt ürünlerinde AFM₁ miktarını, yaz mevsiminde elde edilen süt ve ürünlerinden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Özellikle İran'da yapılan benzer araştırmaların yöreye yakın olması nedeniyle bu çalışma ile paralel sonuçlar arz etmesi oldukça önemlidir.

Mevsimsel farklılıklar göz önüne alınan çalışmalar Türkiye'de de yapılmıştır. Bakırcı (12) Van yöresinden elde edilen 90 süt örneğini İTK yöntemini kullanarak yaptığı araştırma sonucunda 79 (% 87,77) örnekte Aflatoksin M₁ belirlemiş ve bu örneklerin 35'inin (% 44,30) Türkiye ve diğer ülkelerin kabul ettiği sınırların üzerinde AFM₁ taşıdığını rapor etmiştir. Aynı çalışmada araştırmacı 15 günlük dönemler halinde numuneleri 6 farklı tarihlerde (15 Mart-1 Haziran) toplamış olup, en düşük ortalama AFM₁ miktarına 0,0302 ppb ile 1 Haziranda, en yüksek ortalama AFM₁ miktarına ise 0,0636 ppb ile 15 Nisanda rastlamıştır. Haziran ayında topladığı numunelerin % 40'ında ise hiç AFM₁ tespit edilmediğini rapor etmiştir. Süt ürünlerinde en yüksek AFM₁ miktarı Nisan ayı başında bulunmuş olması bu aylarda sığırların beslenmelerinde kullanılan yem ve yem maddelerinin yüksek oranda AFB₁ içerdiği anlamına gelmektedir. Bu aylarda tüketilen yem ve yem maddelerinde AFB₁ miktarının artması üzerine etkili olan en önemli faktörlerin başında şüphesiz ısı ve nem gelmektedir. Çünkü *A. flavus* ve *A. parasiticus* gibi bazı mantarlar % 13-18 nem içeren besinlerde üreyerek toksin sentezleyebilmektedirler. Özellikle % 50-60 nem içeren ortamlarda kolaylıkla üreyebildikleri bilinmektedir. Hatta bu mantarlar % 85-

90 oranındaki nem ve 25 °C'lik ısıda kolaylıkla toksin üretebildikleri bildirilmiştir (12). Bakırcı (12) tarafından tespit edilen sonuçlar, bu araştırma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Bilindiği gibi sağım döneminde bulunan sığırlardan elde edilen süt ve ürünlerinde tespit edilen AFM₁ miktarı bu sığırların beslenmesinde kullanılan yem ve yem maddelerinin AFB₁ içeriği ile doğrudan ilişkilidir. Bu araştırma sonucunda tespit edilen değerler incelendiğinde, hayvanların yaz aylarında AFB₁ ile kirlenmiş besin almadıkları, sonbahar aylarında ise sağlık açısından risk sayılmayacak kadar AFB₁ aldıkları, buna karşın kış ve ilkbahar aylarında hayvanlar yem ve yem maddeleri ile daha çok AFB₁ aldıkları sonucuna varılabilir. Bu durumun en önemli nedeni yaz aylarında hayvanların merada, kış ve ilkbahar aylarında ise ahırda beslenmesi oluşturur. Ayrıca kış ve ilkbahar aylarında hayvan beslemede kullanılan yem, yem hammaddeleri ve ot gibi gıdalarda mantarların üremesi ve toksin sentezlemesi için daha uygun şartların oluştuğu söylenebilir. Bu faktörlerin başında hiç kuşkusuz nem ve ısı oranının yükselmesi gelmektedir. Bu durum aflatoksin kirliliğinin atmasına neden olmaktadır. Ardahan yöresinde süt ve peynir üretimi büyük oranda ilkbahar sonu, yaz ve sonbahar başı aylarına denk gelmektedir. Bu durum kirliliğin insanlara yansımaması açısından büyük bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Kış aylarında yörede süt üretimi neredeyse yok denecek derecededir.

Sonuç olarak, bu çalışmada süt ve kaşar peynir örneklerinde tespit edilen AFM₁ düzeyleri diğer yörelerde yapılan araştırmalara göre daha düşük bulunmuştur. Ardahan İli'nde süt ve kaşar peyniri örneklerinde tespit edilen AFM₁'e en yüksek miktarlarda ilkbahar mevsiminde rastlanılmıştır. İnsan beslenmesinde süt ve süt ürünleri yaygın kullanıldığından AFM₁'in bu ürünlerde bulunması, sağlık açısından büyük bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle süt ve süt ürünlerinde AFM₁'in görülmesinin engellenmesi için hayvanlara verilen yemlerin AFB₁ yönünden sürekli incelenmesi ve belirli düzeylerin üzerinde toksin taşıyan yemlerin hayvan beslemede kullanılmaması gerekmektedir. Ayrıca hayvan beslemede kullanılan maddelerde toksin oluşumunu önleyecek tedbirlerin alınması şarttır. Mantarların gıda maddelerine bulaşmasını önlemek çok zordur. Ancak mikotoksin oluşumunu önleyecek tedbirlerin alınması ile gıda maddelerindeki aflatoksin kirlilikleri kabul

edilebilir düzeylerin altında düşürülebilmektedir. Bunun için gıdalardaki nem, ısı, ve böcek hasarları makul düzeylere düşürülmelidir. Hasat sonrası gıda maddelerinin muhafaza şartlarının iyileştirilmesi gereklidir. Hayvan beslemede kullanılan gıdalar aflatoksin yönünden düzenli aralıklarla çok sıkı denetimden geçirilmelidir. Yapılan analizlerle yüksek düzeyde AFM₁ tespit edilmiş süt ve süt ürünlerinin insan tüketimine sunulmaması için süt üreticileri, hayvan yetiştiricileri ve diğer kişiler düzenli aralıklarla eğitime tabi tutulmalıdır. Aflatoksinlerin zararları ve oluşumlarını engelleyecek tedbirler konusunda yetiştiriciler bilinçlendirilmelidir.

5. ÖZET

Süt ve süt ürünleri iyi bir kalsiyum ve protein kaynağıdır. Bu nedenle insan ve hayvan sağlığı için önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle süt ve süt ürünlerinde aflatoksin gibi zehirli maddelerin bulunmaması gereklidir. Bu araştırmanın amacı, Ardahan ili ve çevresinden toplanan süt ve kaşar peyniri numunelerinde AFM₁ (Aflatoksin M₁) düzeyinin belirlenmesidir. Çalışmada toplam 240 adet süt ve 240 kaşar peynir örnekleri mevsimler göz önüne alınarak, AFM₁ yönünden incelendi. Örneklerin Aflatoksin içeriği kompetitif ELİSA metoduyla araştırıldı. Araştırma sonucunda 66 çiğ inek sütü ve 78 kaşar peyniri örneklerinde AFM₁ tespit edildi (sırasıyla bulaşma oranları % 27,5 ve % 32,5). Ardahan yöresinde üretilen süt ve kaşar peynirlerinde AFM₁ kirliliklerine en fazla İlkbahar mevsiminde rastlandı. Aflatoksin M₁ tespit edilmiş süt örneklerindeki miktarların hiçbirisinin AB ve TGK'da belirlenmiş tolerans sınırı olan 0,05 ppb'yi (50 ng/L) aşmadığı görüldü. Kaşar peynir örneklerinde ilkbahar, kış ve sonbahar mevsiminde değişik düzeylerde AFM₁'e rastlanıldı. Ancak peynirlerde tespit edilen miktarların hiçbirisinin TGK'da yasal tolerans sınırı olarak belirlenen 0,5 ppb'yi (500 ng/Kg) aşmadığı belirlendi. Bu sonuçlara göre Ardahan yöresinden toplanan süt ve kaşar peynirlerinin söz konusu tarihlerde AFM₁ yönünden güvenli olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M₁, ELISA, Süt, Peynir, Ardahan

6. SUMMARY

Milk and dairy product have an important place in a healthy human diet since they are good sources calcium and proteins. Therefore, toxins such as AFM₁ should not be present in milk and milk products. This study was planned in order to determine the presence and level of AFM₁ in milk and kashar cheese samples produced in the Ardahan Region of Turkey. In this study, a total of 240 milk and 240 samples of cheddar cheese were analyzed for aflatoxin M₁ seasonally. Aflatoxin content and concentration of the samples were researched by competitive ELISA method. The incidences of AFM₁ contamination in the samples of raw cow milk and cheddar cheese were 66 (27,5%) and 78 (32,5%) respectively. AFM₁ in milk and cheddar cheese produced in Ardahan province is mostly seen in spring months. The levels of AFM₁ were found to be below the tolerable limits set by EU and Turkish Food Codex (0.05 ppb). Samples of Kashar cheese were encountered to AFM₁ at different levels in spring, summer and autumn. Samples of Kashar cheese were determined to be below the limits of tolerable according to Turkish Food Codex (500 ng/Kg). According to the results of current study, it can be concluded that milk and Kashar Cheese samples are safe for AFM₁ levels for the period in which the samples were collected.

Keywords: Aflatoxin M₁, ELISA, Milk, Cheese, Ardahan

7. KAYNAKLAR

1. Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M.: Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *J. Chromatogr. A.* (932), 153–157, 2001.
2. Aksoy, A., Yavuz, O., Güvenç, D., Daş, Y.K., Terzi, G., Çelik, S.: Determination of aflatoxin levels in raw milk, cheese and dehulled hazelnut samples consumed in Samsun province, Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 16 :13-16, 2010.
3. Anfossi, L., Calderara, M., Baggiani, C., Giovannoli, C., Arletti, E., Giraudi, G.: Development and application of solvent-free extraction for the detection of aflatoxin M₁ in dairy products by enzyme immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* 56 (6):1852-7, 2008.
4. Anklam, E., Stroka, J.: The European perspective of mycotoxins and food safety. In *Int. Workshop on Mycotoxin*. FDA and JIFSAN, University of Maryland. July, 22–26, 2002.
5. Atak, G.: İstanbul'da piyasadan temin edilen kurutulmuş kırmızı biber örneklerinde aflatoksin aranması. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniv., Sağ. Bil. Ens., İstanbul, 1998.
6. Atasever, M.A., Adıgüzel, G., Atasever, M., Özturan, K.: Türkiye (Erzurum)'de tüketilen bazı peynir çeşitlerinde aflatoksin M₁ seviyesinin belirlenmesi, *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 16: 87-91, 2010.
7. Atasever, M.A., Adıgüzel, G., Atasever, M., Özlü, H., Özturan, K.: Türkiye (Erzurum)'de UHT sütlerde aflatoksin M₁ oluşumu, *Kafkas Üni. Vet. Fak. Derg.* 16: 119-122, 2010.
8. Atasever, M.A., Nizamlıoğlu, M., Özturan, K., Karakaya, Y., Ünsal, C.: Erzurum bölgesinde tüketime sunulan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin M₁ yönünden incelenmesi. II. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi (18-20 Eylül 2006, İstanbul) Bildiri Kitabı. 231-40, 2006.
9. Ayçiçek, H., Aksoy, A., Saygi, S.: Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control.* 16: 263–266, 2005.

10. Badii, F., Moss, M.O.: The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. Lett. Appl. Microbiol. 7, 37-39, 1988.
11. Baker, R.L., Brown, R.L., Chen, ZY., Cleveland, T.E., Fakhoury, A.M.: A maize trypsin inhibitor (ZmTIp) with limited activity against *Aspergillus flavus*. Department of plant, soil and agricultural systems, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois 62901, USA. J. Food Prot. 72 (1):185-8, 2009.
12. Bakırcı, İ.: A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. Food Control. 12: 47-51, 2001.
13. Balcı, F.: Yüksek su aktivitesinde depolanan yerfıstıklarında *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoksin oluşumu üzerine bir araştırma, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans tezi, Adana, 1998.
14. Barbieri, G., Bergamini, C., Ori, E., Pesca, P.: Aflatoksin M₁ in parmesan cheese: HPLC determination. J. Food Sci. 59, 1313-1331, 1994.
15. Bash, G., Rae, I.D.: The structure and chemistry of aflatoxins. In Aflatoxin, ed. L. A. Goldblatt. Academic Press, New York, pp. 55-75, 1969.
16. Bennett, J.W., Klich, M.: Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16, 497-516, 2003.
17. Betina, V.: Mycotoxins, chemical, biological and environmental aspects, Elsevier, ISBN 0-444-98885-8, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, pp. 437, 1989.
18. Bijl, J., Petechem, C., Dekeyser, D.: Fluorimetric determination of aflatoxin M₁ in cheese. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70 (3): 472-475, 1987.
19. Blanco, J.L., Dominguez, L., Gomez-Lucia, E., Garayzabal, J.F.F., Garcia, J.A., Suarez, G.: Presence of aflatoxin M₁ in commercial ultra-high-temperature-treated milk. Appl. Environ. Microbiol. 54 (6) :1622-1623, 1988.
20. Bloom, E., Bal, K., Nyman, E., Must, A., Larsson, L.: Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. Appl Environ Microbiol. 73 (13): 4211-7, 2007.
21. Booth, M.S., Mc Donald, L.E.: Veterinary pharmacology and therapeutics. Fifty edition. The Iowa State Univ. Press. Ames, 1982.

22. Bonwick, G.A., Smith, C.J.: Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int. J. Food Sci. Tech.* 39: 817–827, 2004.
23. Bortell, R., Asquith, R.L., Edds, G.T., Simpson, C.F., Aller, W.W.: Acute experimentally induced aflatoxicosis in the weanling pony. *Am. J. Vet. Res.* 44; 2110–2114, 1983.
24. Bozoğlu, F.: Mikotoksin analiz yöntemlerindeki gelişmeler, floresans polarizasyon immünesseyi (FPIA). II. Ulusal mikotoksin senpozyumu bildiri kitabı. S. 26–33, 23–24 Mayıs, 2005, İstanbul.
25. Brown, K.L., Voehler, M.W., Magee, S.M., Harris, C.M., Harris, T.M., Stone, M.P.: Structural perturbations induced by the r-anomer of the aflatoxin B₁ formamidopyrimidine adduct in duplex and single-strand DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (44): 16096–16107, 2009.
26. Bullerman, L.B.: İnhibition of aflatoxin production by cinnamon. *J. Food Sci.* 39: 1163–1165, 1974.
27. Bullerman, L.B.: Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Protec.* 42 (1): 65-86, 1979.
28. Butler, W.H., Lijinsky, W.: Acute toxicity of aflatoxin G₁ to the rat. *J. Pathol.* 102; 209–212, 1970.
29. Campbell, K.W., White, D.G.: Evaluation of corn genotypes for resistance to *Aspergillus* ear rot, kernel infection and aflatoxin production. *Plant Dis.* 79, 1039-1045, 1995.
30. Candlish, A., Pearson, S., Aidoo, K., Smith, J., Kelly, B., Irvine, H.: A survey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content, *Food Add. and Contam.* 18 (2): 129-136, 2001.
31. Cauderay, P.: Rapid chemical confirmation method for aflatoxins B₁ and G₁ by direct acetylation on a thin layer plate before chromatography. *J. Assoc. Off. Analyt. Chem.* 62: 197, 1979.
32. Chao, T.C., Maxwell, S.M., Wong, S.Y.: An outbreak of aflatoxicosis and boric acid poisoning in malaysia: a clinical pathological study. *J. Pathol.* 164; 225–233, 1991.

33. Chu, F.S.: İmmunoassays for analysis of mycotoxins. *J. Food Protect* 47 (7): 562-569, 1984.
34. Chu, F.S., and Ueno, I.: Production of antibody against aflatoxin B₁. *Apl. Environ. Microbiol.* 33: 1125–1128, 1977.
35. Clarch, J., Hatch, R.C., Miller, D.M., Jain, A.V.: Caprine aflatoxicosis: experimental disease and clinical pathologic changes. *Am. J. Vet. Res.* 45; 1132–1135, 1984.
36. Codex Alimentarius. Maximum level for aflatoxin M₁ in milk. *Codex Stand.* 232, 2001.
37. Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Trampel, D.W.: Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: Rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B₁ and M₁. *Am. J. Vet. Res.* 47; 1817–1825, 1986.
38. Coppock, R.W., Reynolds, R.D., Buck, W.B., Jacobsen, B.J., Ross, S.C., Mostrom, M.S.: Acute aflatoxicosis in feeder pigs, resulting from improper storage of corn. *J. A. V. M. A.* 195; 1380–1381, 1985.
39. Coulombe, R.A.: Biological action of mycotoxins, *J. Dairy. Sci.* 76 (3): 880-891, 1993.
40. Creppy, E.E.: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127, 19-28, 2002.
41. Çoksöyler, N.: Ekstraksiyon ve ekstrakt temizleme. Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Seminer Notları, Mersin, 1997.
42. Davis, N. D. ve Diener, U. L.: Mycotoxins. In *Food and beverage Mycology*, ed. L. R. Beuchat. AVI Publishing Company, West Port, CT, pp. 397–444, 1979.
43. Dogan, E.: Mikotoksinlerin analiz yöntemleri. KAÜ. Sağlık Bilimleri Enst., Doktora Semineri, 2008.
44. Dragacci, S., Grosso, F., Pfauwathel-Marchond, N., Fremy, J.M., Venant, A., Lombard, B.: Proficiency testing for the evaluation of the ability of European Union-National Reference Laboratories to determine aflatoxin M₁ in milk at

- levels corresponding to the new European Union legislation. *Food Add. and Contam.* 18 (5): 405-415, 2001.
45. Edlayne, G., Simone, A., Felicio, J.D.: Chemical and biological approaches for mycotoxin control: a review. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 1 (2):155-61, 2009.
 46. Erdoğan, A., Gürses, M., Sert, S.: Peynirler ve küf toksinleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Tekirdağ.
 47. Erkahveci, A.: Kırmızı toz biberlerde aflatoksin miktar tayininde kullanılabilir üç farklı analiz metodunun karşılaştırılması. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1996.
 48. Erkahveci, A., Karaali, A.: Kırmızı toz biberde kullanılabilir üç farklı analiz metodunun karşılaştırılması. Gıda Mühendisliği III. Ulusal Sempozyumu, 22–23 Eylül, ODTÜ Kampusü, Ankara, 1997.
 49. Evren, M.: Aflatoksinlerin etki şekilleri, gıdalarda bulunma durumları ve önleme çareleri, O.M.Ü. Ziraat Fak. Derg. 14 (2), 1999.
 50. Fallah, A.A.: Aflatoxin M₁ contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control.* 21: 1478–1481, 2010.
 51. FAO: Current Limits and regulations on Mycotoxins. Joint FAO/WHO/UNEP Second International Conference on Mycotoxins. Bangkok, Thailand, 1987
 52. FAO: Distribution of Mycotoxins-an Analysis of Worldwide Commodities Data, Including Data from FAO/WHO/UNEP Food Contamination Monitoring Programme. Joint FAO/WHO/UNEP Second International Conference on Mycotoxins Bangkok, Thailand, 1987.
 53. Fink-Gremmels, J.: Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Vet. Quart.* 21 (4): 115-120, 1999.
 54. Galvano, F., Galofaro, V., Galvano, G.: Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: a worldwide review. *J. Food Prot.* 59, 1079–1090, 1996.
 55. Galvano, F., Galofaro, V., Angelis, AD., Galvano, M., Bognanno, M., Galvano, G.: Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy. *J. Food Protec.* 61 (6), 738-741, 1998.

56. Groopman, J.D., Kensler, T.W.: Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and relationship to Cancer. *CRC Critical Rev. Toxicol.* 19 (2): 113-145, 1988.
57. Groopman, J.D., Kensler, T.W., Wild, C.P.: Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annu Rev. Public Health.* 29: 187–203, 2008.
58. Guo, B.Z., Butron, A., Windstrom, N., Lynch, R.E.: Restriction fragment length polymorphism assesment of the heterogeneous nature of maize population GT-MAS: gk and field evaluation of resistance to aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.* 65 (1): 167-171, 2002.
59. Gurtoo, H.L., Motycka, L.: Effects of sex difference on the in vitro and in vivo metabolism of aflatoxin B₁ by the rat. *Can. Res.* 36: 4663–4671, 1976.
60. Gündinç, U., Filazi, A.: Detection of aflatoxin M₁ concentrations in UHT milk consumed in Turkey markets by ELISA, *Pak. J.Biol. Sci.* 12(8): 653-6, 2009.
61. Gürbay, A., Aydın, S., Girgin, G., Engin, A.B., Şahin, G.: Assessment of aflatoxin M₁ levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control.* 17: 1–4, 2006.
62. Hamitton, D.: Toxic Fungus Threatens Health of Consumers. www.agnic.org/pmp/2000/ama0826.htm, 2000.
63. Hartl, M., Humpf, H.U.: Simultaneous determination of fumonisin B(1) and hydrolyzed fumonisin B(1) in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 47 (12): 5078–83, 1999.
64. Hayes, R.B., van Nieuwenhuize, J.P., Raatgever, J.W., ten Kate, F.J.: Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. *Food Chem. Toxicol.* 22; 39–43, 1984.
65. Hışıl, Y.: Enstrümental Gıda Analizleri-I, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları, Yayın No: 31, 119-126, 1994.
66. Hışıl, Y.: Enstrümental Gıda Analizleri (I). Ege Üniv. Basımevi, Bornova-İzmir, 1999.
67. Hill, R.A., Wilson, D.M., Burg, W.R. and Shotwell, O.L.: Viable fungi in corn dust. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 84–87, 1984.

68. Hussain, I., Anwar, J., Asi, M.R., Munawar, M.A., Kashif, M.: Aflatoxin M₁ contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control*. 21: 122–124, 2010.
69. Hussein, H.S., Brasel, J.M.: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167: 101–134, 2001.
70. Kabak, B.: Bazı Mikotoksinlerin detoksifikasyonunda *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* şuşlarının kullanımı, Çukurova Üni. Fen Bilimleri Ens., Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana, 2007.
71. Kamkar, A.: A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*. 16: 593-599, 2005.
72. Karakaya, Y., Atasever, M.: Mısır silajında aflatoksin B₁ varlığının ve süte geçme durumunun araştırılması. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 16: S123-S127, 2010.
73. Kaya, S.: Süt yemi ve çiğ sütte aflatoksin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması. *AÜ. Vet. Fak. Derg.* 29 (3–4): 443–457, 1982.
74. Kaya, S., Şanlı, Y., Özkazanç, A.N.: Küflenmekten şüpheli yem ve yem hammaddelerinde aflatoksinler. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 32: 1-12, 1985.
75. Keskin, Y., Başkaya, R., Karşlı, S., Yurdun, T., Ozyaral, O.: Detection of aflatoxin M₁ in human breast milk and raw cow's milk in Istanbul, Turkey, *J Food Prot.* 72 (4): 885-889, 2009.
76. Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H.: (Çeviri Edit.) *Enstrümantal Analiz, Gaz Kromatografi, Bölüm 27. II. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998.*
77. Kireççi, E., Savaşçı, M., Ayyıldız, A.: Sarıkamış'ta tüketilen süt ve peynir ürünlerinde Aflatoksin M₁ varlığının belirlenmesi. *İnfeksiyon Derg.* 21 (2): 93-96, 2007.
78. Koch, P.: State of the art of trichothecenes analysis. Swiss quality testing services, grünaustasse 23, CH–8953, Dietikon, Switzerland. *Toxicol Lett.* 153 (1):109–12, 2004.
79. Kos. G., Krska, R.: Fact Sheets on Analytical Methods, 7. Aflatoxins, European Mycotoxin Awareness Network, 2006.
80. Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., Crews, C.: Mycotoxin analysis: an update. Christian doppler laboratory for

- mycotoxin research, center for analytical chemistry, department for agrobiotechnology (IFA Tulln). University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, A-3430 Tulln. Austria. 25 (2):152–63, 2008.
81. Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Huff, W.E.: Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poult. Sci.* 69; 727-735, 1990.
 82. Lanyasunya, T.P., Wamae, L.W., Musa, H.H., Olowofeso, O., Lokwaleput, I.K.: The risk of mycotoxins contamination of dairy feed and milk on smallholder dairy farms in Kenya. *Pak. J.Nutr.* 4, 162–169, 2005.
 83. Launay, F.M., Young, P.B., Sterk, S.S., Blokland, M.H., Kennedy, D.G.: Confirmatory assay for zeranol, taleranol and the *Fusarium* spp. toxins in bovine urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 21 (1):52–62, 2004.
 84. Lopez, C.E., Ramos, L.L., Ramadan, S.S., Bulacio, L.C., Perez, J.: Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 211–215, 2001.
 85. Lopez, C.E., Ramos, L.L., Ramadan, S.S., Bulacio, L.C.: Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. *Food Control* 14 (1): 31–34, 2003.
 86. Luzi, A., Cometa, M.F., Palmery, M.: Acute effects of aflatoxins on guinea pig isolated ileum. *Toxicology in Vitro.* 16; 525–529, 2002.
 87. Loughheed, M.D., Roos, J.O., Waddel, W.R., Munt, P.W.: Desquamative interstitial pneumonitis and diffuse alveolar damage in textile workers. Potential role of mycotoxins. *Chest.* 108; 1196–1200, 1995.
 88. Martins, M.L., Martins, H.M.: Aflatoxin M₁ in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food Addit Contam.* 17, 871-874, 2000.
 89. Mclean, M., Dutton, M.F.: Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol. Ther.* 65 (2):163-92, 1995.
 90. Mello, J.P.F.D., Macdonald A.M.C.: Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69: 155-166, 1997.

91. Micheals, S.M., John, R.C.: Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B₁-C¹⁴ in broiler chicken. *Appl. Microbiol.* 25: 763-769, 1973.
92. Minitab Release 12.1: Minitab for Windows Inc., 1998.
93. Muscarella, M., Magro, S.L., Nardiello, D., Palermo, C., Centonze, D.: Development of a new analytical method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in food products based on high performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization. *J. Chromatogr. A.* 1203 (1): 88–93, 2008.
94. Nasır, M.S., Jolley, M.E.: Fluorescence polarization (FP) assays for the determination of grain mycotoxins (Fumonisin, DON, vomitoxin and aflatoxins). *Comb. Chem. High T. Scr.* 6: 267–273, 2003.
95. Nesheim, S.: Fading of aflatoxin spots on TLC plates during fluorescence densitometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 54: 1444–1445, 1971
96. Nesheim, S.: Method of aflatoxins analysis. Pages identity of aflatoxins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 945A-948A, 1979.
97. Oruç, H.H.: Mikotoksinler ve tanı yöntemleri. *Uludağ Üniv. J. Fac. Vet. Med.* 1–2–3–4: 105–110(24), 2005.
98. Oruç, H.H ve Sonal, S.: Determination of aflatoxin M₁ levels in cheese and milk consumed in Bursa, Turkey. *Vet. Hum. Toxicol.* 43 (5) : 292-293, 2001.
99. Oruç H.H, Kalkankı, Ö., Cengiz, M., Sonal, S.: Aflatoxin M₁ in raw milks collected from plain and mountain villages in Bursa, Turkey *Milchwissenschaft/Milk. Sci. Int.* 60 (1) : 71-72, 2005.
100. Oyelami, O.A., Maxwell, S.M., Adelusola, K.A., Aledokoma, T.A., Oyelese, A.O.: Aflatoxins in the lungs of children with kwashiorkor and children with miscellaneous diseases in Nigeria. *J. Toxicol. Environ. Health.* 51; 623–628, 1997.
101. Özdemir, M.: Determination of Aflatoxin M₁ levels in goat milk consumed in Kilis province, *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* 54, 99-103, 2007.
102. Özkaya, Ş., Taydaş, E.E., Başaran, A., Avcı, B., Hızlı, S.: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı Aflatoxin Analiz Kurs Notları. 7–14 Ağustos, Ankara, 1999.

103. Özkaya, Ş ve Temiz, A.: Aflatoksinler: kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Derg.* 1 (1): 1-21, 2003.
104. Öztürk, B.: Yoğurt ve Kefirde Aflatoksin Detoksifikasyonu Üzerine Araştırmalar. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kars, 2004.
105. Park, D.: Mycotoxin control-regualtions. In *Int. Workshop on Mycotoxin.* FDA and Jifsan, University of Maryland. July,22–26, 2002.
106. Park, DL., Liang, B.: Perpectives on aflatoxin control for human food animal feed. *Trends in Food Sci. Technol.* 4: 334-342, 1993.
107. Park, J.J., Chu, F.S.: Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *J. AOAC İnt.* 79 (2): 465-71, 1996.
108. Patten, R.C.: Aflatoxins and disease. *Am. J. Tropic. Med. Hygiene.* 30; 422–425, 1981.
109. Peadar, GL., Lynch, PB. : Mycotoxin in pig feeds. *Irish Vet. J.* 54 (4), 2001.
110. Peraica, M., Radia, B., Lucia, A., Pavlovia, M.: Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization.* 77; 754–766, 1999.
111. Pier, A.C.: Major biological consequence of aflatoxicosis in animal production. *J. Anim. Sci.* 70; 3964–3967, 1992.
112. Pittet, A.: Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update review. *Rev. Med. Vet.* 149, 479-492, 1998.
113. Prasongsidh, BC., Kailasapathy, K., Skurray, GR., Bryden, WL.: Stability of cyclopiazonic acid during storage and processing of milk. *Food Res. Int.* 30 (10): 793–798, 1997.
114. Price, W.D., Lovell, R.A., McChesney, D.G.: Naturally occurring toxins in feedstuffs: Center for veterinary medicine perspective. *J. Anim. Sci.* 71; 2556–2562, 1993.
115. Railey, Joan., Mandel, HG., Sinha, S., Judahand, DL., Neal, GE.: Invitro activation of human Harvey -ras Proto Onco gene by aflatoxin B₁. *Carcinogenesis.* Vol. 18, 905-910, 1997.

116. Ramos, A.J., Hernandez, E. : Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Anim. Feed Sci. Techn.* 65; 197–206, 1997.
117. Rastogi, S., Dwivedi, P.D., Khanna, S.K., Das, M.: Detection of aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control.* 15, 287–290, 2004.
118. Ready, C.V.: Aflatoxins in feed.: An enemy to poultry producers in the topic. *Misset World Poult.* 8. (6); 19–21, 1992.
119. R-Biopharm GmbH: Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxins. Ridascreen Aflatoxin M₁ Art. No.: R-1101. Darmstadt, Germany, 1999.
120. Robens, J.F., Richard, J.L.: Aflatoxins in animal and human health. *Rev Environ. Contam. Toxicol.* No: 127: 69–94, 1992.
121. Ruprich, J., Ostry, V.: Immunochemical methods in health risk assessment: cross reactivity of antibodies against mycotoxin deoxynivalenol with deoxynivalenol-3-glucoside. *Cent. Eur. J.Public. Health.* 16(1): 34–7, 2008.
122. Russell, L., Cox, D.F., Larsen, G., Bodwell, K., Nelson, C.E.: Incidence of molds and mycotoxins in commercial animal feed mills in seven midwestern states 1988–1989. *J. Anim. Sci.* 69, 5–12, 1991.
123. Salhap, A.S., Russell, G.F., Coughlin, J.R., Hsieh, D.P.: Gas-liquid chromatography and mass spectrometric ion selective detection of sterigmatocystin in grains. *J. Assoc Off. Anal. Chem.* 59(5): 1037–44, 1976.
124. Santin, E.: Micotoxicoses. In: Berchieri Jr, A., Macari, M. (Eds). *Doenças das Aves. Facta Campinas.* pp: 379–388, 2000.
125. Sargeant, K., Sheridan, A., O’Kelly, J. Carnaghan, R. B. A. : Toxicity associated with certain samples of groundnut. *Nature.* 192; 1095–1097, 1961.
126. Sarımeahmetoğlu, B., Kuplulu, Ö., Çelik, T.H.: Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control.* 15: 45–49, 2004.
127. Schaafsma, A.W., Miller, J.D., Savard, M.E., Ewing, R.J.: Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method, corn hybrid and species of *Fusarium*. *Can. J. Plant. Pathol.* 15, 185–192, 1993.

128. Schneider, E., Curtui, V., Seidler, C., Dietrich, R., Usleber, E., Martlbauer, E.: Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicol. Lett.* 153(1): 113–21, 2004.
129. Seitz, L.M.: Comparison of methods for aflatoxin analysis by high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 104: 81–89, 1975.
130. Shank, R.C., Wogan, G.B.: Distribution and excretion of C¹⁴ labelled aflatoxin B₁ in the rat. *Food Proc.* 24: 627, 1965.
131. Shim, W.B., Kolosowa, A.Y., Kim, Y.J., Yang, Z.Y., Park, S.J., Eremin, S.A., Lee, I.S., Chung, D.H.: Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A. *Int. J. Food Sci. Tech.* 39: 829–837, 2004.
132. Smela, M.E., Curier, S.S.: The chemistry and biology of aflatoxin B₁, *Carcinogenesis*. Vol., 22, No: 4, 535-545, 2001.
133. Smith, J.E., Moss, M.O.: *Mycotoxins: Formation, analysis and significance*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 36-41. 1985.
134. Sorensen, L.K., Elbaek, T.H.: Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 820:183–196, 2005.
135. Steyn, P.S., Stander, M.A. "Mycotoxins with special reference to the carcinogenic mycotoxins: Aflatoxins, ochratoxins and fumonisins". Ballantine, B., Mars, T.C., Syversen, T.C.M., (Eds.) *General and Appl. Toxicol.* United Kingdom, Macmillian Reference Ltd. Cilt 32. baskı, sayfa 2145, 1999.
136. Stoloff, L., Van Egmond, H.P., Parks, D.L.: Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 8, 222–231, 1991.
137. Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R.V., Breiman, R., Brune, M.N.: Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ. Health Perspect.* 114:1898–1903, 2006.
138. Sugiyama, K., Hiraoka, H., Konishi, Y.S.: Aflatoxin M₁ contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B₁ in corn supplied to dairy cattle in Japan. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 49(5), 352-355, 2008.

139. Swenson, O.H., Lin, J.K., Miller, E.C., Millet, J.A.: Aflatoxin B₁ 2,3-oxid as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxin B₁ and B₂ to the liver DNA and ribosomal RNA in vivo. *Can. Res.* 37: 172–181, 1977.
140. Şanlı, Y., Ceylan, S., Kaya, S.: Tavuk yemlerinde ve yem ilkel maddelerinde aflatoxinler. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* 29; 473–492, 1982.
141. Şanlı, Y ve Kaya, S.: Veteriner Klinik Toksikoloji. Medisan Yayınevi. Yayın No:21 Ankara, 1994.
142. Şanlı, Y., Kaya, S., Pirinçci, İ., Yavuz, H., Baydan, E., Demet, Ö., Bilgili, A.: Veteriner Klinik Toksikoloji. Medisan Yayınevi. Yayın No: 21. Ankara, 1995.
143. Tajkarimi, M., Aliabadi, F., Nejad, A.S., Poursoltani, H., Motallebi, A.A., Mahdavi, H.: Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in İnan. *Food Control.* 19, 1033-1036, 2008.
144. Tandon, H.D., Tandon, B.M., Ramalingaswami, V.: Epidemic of toxic hepatitis in İndia of possible mycotoxin origin. *Archiv. Pathol. Lab. Med.* 102; 372–376, 1978.
145. Tayfur, M.: Besinlerdeki küfler ve mikotoksinler. *Beslenme ve Diyet Derg.* 22(1): 101-108, 1993.
146. Tekinşen, K.K., Eken, H.S.: Aflatoxin M₁ levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 46 (10):3287-9, 2008.
147. Thirumala-Devi, K., Mayo, MA., Reddy, G., Reddy, D.: Occurence of aflatoxins and ochratoxin A in İndian poultry fedds. *J. Food Prot.* 65(8): 1338-1340, 2002.
148. Toloff, L., Castegnaro, M., Scott, P., Neill, I.K., and Bartsch, H.: Environment carcinogens. Selected methods of analysis. Vol. 5. Some mycotoxins. Sci. Pub. No. 44. Lyon, Cedex, France: International Agency for Research on Cancer. 1982.
149. Trail, F., Mahanti, N., Linz, J.: Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology.* 141:755-765, 1995.
150. Türk Gıda Kodeksi Tebliğ: Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, Resmi Gazete, 23.09.2002, Sayı: 24885, 2002.

151. Türk Gıda Kodeksi Tebliğ: Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, (Tebliğ No: 2008/26), Resmi Gazete, 17.05.2008, Sayı: 26879, 2008.
152. Ueno, Y.: The Toxicology of Mycotoxins. CRC Critical Rev. Toxicol. 14 (2), 99-132, 1985.
153. Unusan, N.: Occurrence of aflatoxin M₁ in UHT milk in Turkey, Selcuk University, Education Faculty, 42090 Konya, Turkey. Food Chem. Toxicol. 44: 1897-1900, 2006.
154. Ünlütürk, A., Turantaş, F.: Gıda Mikrobiyolojisi. Ege Üniversitesi Yayınları, 1. Baskı, İzmir, 1998.
155. Van Egmond, H.P.: Aflatoxin M₁: Occurrence, Toxicity, Regulation. In: Mycotoxins in Dairy Products. Ed: Van Egmond Hp London, Elsevier, p: 11-49, 1989.
156. Var, I., Kabak, B., Özkarslı, M: Mikotoksin Aranmasında Kullanılan Analiz Yöntemleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Derg. 2 (11): 1-11, 2004.
157. Vleet, T., Klein, P., Coulombe, R.: Metabolism of aflatoxin B₁ by normal human bronchial epithelial cells. J. Toxicol. Env. Health. Part A. 63 (7): 525-540, 2001.
158. Wagon, G.N.: Mycotoxins. Ann. Res. Pharmacol. 15: 437-451, 1975.
159. Who/Fao. Who Food Additives Series: 47. Fao Food and Nutrition Paper. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Ochratoxin A. 281-680, Geneva, 2001.
160. Wild, C.P., Gong, Y.Y.: Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. Carcinogenesis. 31(1): 71-82, 2010.
161. Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D.: Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am. J. Clin. Nutr. 80: 1106-1122, 2004.
162. Yaroğlu, T., Oruç, H.H., Tayar, M.: Aflatoxin M₁ levels in cheese samples from some provinces of Turkey. Food Control. 16: 883-885, 2005.

163. Yarsan, E., Özdemir, M.: Aflatoksinlerin insan ve hayvan sağlığı yönünden önemi ve aflatoksinlerin yıkımlanmasına yönelik uygulamalar. A.Ü Vet. Fak. Derg. 1; 41–49, 1997.
164. Zerfiridis, G.: Potential aflatoxin hazards to human health from direct mold growth on Teleme Cheese. J. Dairy Sci. 68: 2184-2188, 1984.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ardahan İli Göle İlçesinde 20.08.1976 yılında doğdu. İlköğrenimini Yeni Demirkapı Köyü İlkokulunda 1987 yılında bitirdi. Orta ve Lise öğrenimini Göle 100. Yıl Lisesi'nde 1993 yılında tamamladı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesine 1996 yılında girdi ve aynı Fakülteden 2001 yılında mezun oldu. Kasım-2001 de başlayan askerlik görevini Temmuz-2002 de tamamladı. Göle ilçesinde 2002 ve 2004 yılları arasında serbest Veteriner Hekim olarak görev yaptı. Ocak-2004 ile Aralık-2006 yılları arasında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı bünyesinde Tarım Danışmanı olarak çalıştı. Ocak-2007 yılından beri aynı Bakanlık bünyesinde Uzman Tarım Yayımcısı olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.