

İSTANBUL'DA SATIŞA SUNULAN İÇME SÜTÜ ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN M1 DÜZEYLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**Kamil BOSTAN* Ömer ÇETİN* Serkan Kemal BÜYÜKÜNAL* Özer ERGÜN*****ÖZET**

Bu çalışmada İstanbul'da satışa sunulan toplam 67 içme sütü örneğinde ELISA tekniği ile aflatoksin M1 (AFM1) varlığı araştırılmıştır. İncelenen süt örneklerinin 16'sında (% 23.88) 10-25 ppt arasında; 29'unda (% 43.28), 25-50 ppt arasında; 9'unda (% 13.43) 51-75 ppt arasında ve 7'sinde (% 10.45) 75 ppt'den fazla AFM1 saptanmıştır.

Örneklerin 16'sında (% 23.88) AFM1 miktarı yasal limit olan 50 ppt'den yüksek bulunmuştur. Altı içme sütü örneğinde ise tespit edilebilir düzeyde (10 ppt) AFM1 saptanmamıştır. Pastörize süt ve UHT sütler arasında AFM1 içeriği açısından belirgin bir farklılık saptanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular ülkemizdeki içme sütlerinin AFM1 içeriğinin yüksek olması nedeniyle halk sağlığı açısından riskli olabileceğini ve bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılmasının gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler : Süt, Aflatoksin M1**SUMMARY**

In this study, totally 67 drinking milk samples sold in Istanbul were investigated for the levels of aflatoxin M1 (AFM1) by ELISA technique. AFM1 levels were between 10-25 ppt in 16 samples (23,9 %), between 25-50 ppt in 29 samples (43.3 %), between 51-75 ppt in 9 samples (13.4 %) and more than 75 ppt in 7 samples. Sixteen milk samples (23.9%) were contaminate at levels above the legal limit (50 ppt) for AFM1. Six milk samples had not AFM1 at detectable level (10 ppt). An evident difference for aflatoxin M1 content was no found between pasteurised milk and UHT milk samples. The results indicated that AFM1 contents of the drink milk may be high level for human health.

Key Words : Milk, Aflatoxin M1**1. GİRİŞ**

Çeşitli bakterilerin gıda maddelerinde toksin oluşturarak tüketicilerde ciddi sağlık sorunlarına yol açtığı bilinmektedir. Bakterilerin yanı sıra bazı küf mantarlarının salgılamış oldukları mikotoksinler de gıda maddelerinde bulunabilir. Mikotoksinlerin çoğu hepatotoksik, nefrotoksik ve neurotoksik olup karaciğer, böbrek ve sinir sisteminde ciddi bozukluklar oluşturabilir. Karsinojen, mutajen, teratojen, tremorjen etki gösterebilirler (Cole ve Cox, 1981; Hsieh, 1989; Eaton, 1994). Mikotoksin meydana getiren küf mantarlarının başında *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türleri gelir. Aflatoksinler mikotoksinler içinde en tanınmış olanlarıdır. Aflatoksin B1, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından oluşturulan aflatoksinlerin içinde en toksik olanıdır (Uğur ve ark., 1999). Daha çok kuru gıdalarda ve hayvan yemlerinde bulunur. Küflü ve Aflotoksin B1 içeren yem maddelerin süt hayvanları tarafından tüketimi sonucu 24-48 saat içinde aflatoksin M1 formunda süte geçebilmektedir (Van Egmond, 1989; Skrinjar ve ark., 1992; Pittet, 1998). Aflatoksin M1'inde karsinojenik etkisi bilinmektedir (Rothschild, 1992). Aflatoksin M1 sadece sütte değil, kontamine sütlerden yapılan süt ürünlerinde de bulunabilmektedir.

Martins ve Martins, 2000; Bakırcı, 2001; Galvano ve ark., 2001; Lopez ve ark., 2001; Oruç ve Sonel, 2001; Panariti, 2001, Lopez ve ark., 2003; Özkaya ve ark., 2003).

Gıda maddelerinde zararlı etken maddelerin saptanmasında günümüzde hızlı analiz teknikleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlardan birisi de ELISA tekniğidir ve çeşitli mikrobiyel toksinlerin gıdalardaki varlığı ng/kg düzeyinde bu teknikle ortaya konulabilmektedir. Bu çalışma, halk sağlığının korunmasına yönelik olarak ELISA tekniği ile içme sütlerinde aflatoksin M1 düzeylerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Araştırma Materyali

Bu çalışmada 21'i pastörize, 46'sı UHT olmak üzere toplam 67 içme sütü örneği analiz edilmiştir. Süt örnekleri Mayıs-Ağustos 2001 ayları içinde İstanbul'daki çeşitli perakende satış noktalarından temin edilmiştir.

2.2 Aflatoksin M1 (AFM1) Saptanması

Pastörize süt ve UHT süt örneklerinde aflatoksin M1 mevcudiyeti Competitive ELISA tekniği ile Ridascreen Aflatoksin M1 test kiti (Biopharm, R1101) kullanılarak kantitatif olarak saptanmıştır. Test kiti minimum 10 ppt düzeyine kadar AFM1'i tespit edebilmektedir. İlk olarak, süt örnekleri 10°C'de 3500 devirde 10 dakika santrifüje edilmiş ve üstte toplanan yağ tabakası aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Geri kalan yağsız kısım test için kullanılmıştır. Standart solüsyonlar ve test için hazırlanan örnekler 100'er ve paralel olarak plate üzerinde kendileri için ayrılan kuyucuklara konulduktan sonra oda ısısında karanlıkta 60 dakika bekletilmiştir. Daha sonra yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Seyreltilmiş enzim konjugattan her kuyucuğa 100 ilave edilip oda sıcaklığında karanlıkta 60 dakika kadar bekletilmiş ve tekrar yıkama işlemi yapılmıştır. Her kuyucuğa 50 substrat ve 50 chromogen ilave edilmiş, 30 dakikalık bekletme süresinde sonra 100'er durdurucu solüsyonu ilave edilip köre karşı 450 nm'de okuma işlemi gerçekleştirilmiştir (Märtlbauer ve Terplan, 1985).

3. BULGULAR

İncelenen 21 pastörize süt örneğinin 19'unda ve 46 UHT süt örneğinin 42'sinde ELISA tekniği ile yapılan analizlerde saptanabilir değer olan 10 ppt'nin üzerinde aflatoksin M1 tespit edilmiştir (Çizelge 1). Toplam 67 örnekten 16'sında (% 23.88) aflatoksin M1 miktarı 50 ppt'nin üzerinde bulunmuştur. En yüksek AFM1 miktarları pastörize sütlerde 144 ppt; UHT sütlerde 161 ppt olarak belirlenmiştir. Ortalama AFM1 düzeyleri ise pastörize sütlerde 35.4 ppt; UHT sütlerde 41.2 ppt ve bütün örneklerde (total olarak) 39.4 ppt olarak saptanmıştır.

Çizelge 1. Pastörize Süt ve UHT Sütlerde AFM1 Seviyeleri

AFM ₁ seviyesi	Pastörize süt (n:21)	UHT süt (n: 46)	Toplam (n: 67)
	Örnek Sayısı	Örnek Sayısı	Örnek Sayısı (%)
< 10 ppt	2	4	6 (8.96)
10-25 ppt	6	10	16 (23.88)
25-50 ppt	7	22	29 (43.28)
51-75 ppt	3	6	9 (13.43)
> 75 ppt	3	4	7 (10.45)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada İstanbul piyasasından temin edilen ısıtılmış 67 içme sütü örneğinin 61'inde (% 91.04) AFM1 varlığı saptanmış; 6'sında (% 8.96) tespit edilebilir düzeyde AFM1 saptanmamıştır. Diğer bir çok araştırmacı tarafından da yüksek insidensler bildirilmiştir. Martins ve Martins (2000) Portekiz'deki çiftliklerden temin edilen 31 çiğ süt ve marketlerden temin edilen 70 UHT süt olmak üzere toplam 101 içme sütü örneğindeki AFM1 bulunma insidensini % 83.2 olarak saptamışlardır. Suda çözünür olduğundan peynir altı suyuna (whey) geçiş oranı en yüksektir; krema ve terayağda ise en düşüktür. Önemli bir kısmı peynir altı suyuna karışsa da kazeine bağlanarak değişen oranlarda peynire de geçmektedir. Üretim proseslerinden etkilenmediğinden zaman zaman peynirlerde yüksek oranlarda rastlanmaktadır. Çeşitli ülkelerde içme sütlerinde ve süt ürünlerinde yapılan analizlerde değişen oranlarda aflatoxin M1'e rastlanmıştır (Stoloff ve ark. 1981; Vesely ve Vesela, 1983; Blanco ve ark., 1988; Piva ve ark., 1988; Sylos ve ark., 1996; Markaki ve Melissari, 1997; Peitri ve ark., 1997; Galvano ve ark., 1998;

İtalya'da 1995 ve 1996'da birbirinin devamı şeklinde yapılan iki tarama çalışmasında insidensi sırasıyla % 86 ve % 78 olarak bildirilmiştir (Galvano ve ark., 1998; Galvano ve ark., 2001). Kim ve ark. (2000) da ELISA tekniği ile pastörize sütlerdeki AFM1 insidensini % 76 olarak saptamışlardır.

Bazı araştırmacılar tarafından ise daha düşük oranlar bildirilmiştir. Piva ve ark. (1988) 1984 yılında İtalya'da pazarlanan toplam 313 süt örneği üzerinde yaptıkları çalışmada Almanya'dan ithal edilen sütlerin % 13.8'inin ve Fransa'dan ithal edilen sütlerin % 12.5'inin aflatoxin M1 içerdiğini, 1985 yılında çiftliklerden topladıkları 276 süt örneğinin 70'inde (% 25.3) çok düşük seviyelerde AFM1 bulunduğunu bildirmişlerdir. İspanya'da yapılan bir çalışmada da 47 süt örneğinin 14'ü (% 29.8) AFM1 yönünden pozitif bulunmuştur (Blanco ve ark., 1988).

Gerek ulusal gerekse uluslar arası standartlarda içme sütlerinde tolere edilebilir AFM1 içeriği 50 ppt olarak gösterilmektedir. Çalışmamızda yüksek insidense rağmen örneklerdeki ortalama AFM1 miktarı (39.4 ppt) sınır değerinin altındadır. Buna rağmen, incelediğimiz örneklerinin 16 adedinde (% 23.88) AFM1 içeriği bu limitin üzerinde bulunmuştur. En yüksek AFM1 seviyesi ise 144 ppt olarak saptanmıştır. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda standart dışı numune oranları, saptanan en yüksek veya ortalama AFM1 miktarları nispeten düşük bulunmuştur. Martins ve Martins (2000) inceledikleri 101 süt örneğinden sadece ikisinde yasal sınır değerlerin üzerinde (59 ve 61 ppt) AFM1 saptamışlardır. Piva ve ark. (1988) ise ithal sütler üzerinde yaptıkları incelemelerde kontaminasyon düzeyinin düşük olduğunu (maksimum 23 ppt) bildirmişlerdir. Atina'da yapılan bir çalışmada da (Markaki ve Melissari, 1997) aynı şekilde pastörize sütlerdeki AFM1 seviyeleri izin verilen limitlerin çok altında (< 5 ppt) bulunmuştur. Arjantin'den bildirilen bir başka çalışmada (Lopez ve ark., 2003) da kış sütleri üzerinde yaptıkları incelemede 77 süt örneğinden sadece 18'inin (% 23) AFM1 ile kontamine olduğunu ve saptanan miktarların maksimum tolere edilebilir seviyenin altında bulunduğunu bildirmişlerdir. Galvano ve ark. (1998) ise çalışmamızdakine benzer bir şekilde yüksek bulunma insidensinin yanı sıra en yüksek AFM1 miktarını 108.5 ppt olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacıların daha sonraki bir çalışmasında ise AFM1 seviyeleri 1-23.5 ppt arasında bildirilmiştir (Galvano ve ark., 2001). Vesely ve Vesela (1983) de bulgularımıza benzerlik gösterecek şekilde 1980 baharında inceledikleri 67 süt örneğinin 9'unun 50-100 ppt arasında AFM1 içerdiğini tespit etmişlerdir.

Sütlerde bildirilen AFM1 miktarları ve insidensleri analiz yöntemine göre de değişmektedir. Sylos ve ark. (1996) da Brezilya'da 1989-1990 yılları arasında ince tabaka kromatografi tekniği ile inceledikleri 152 süt ve süt ürününün hiçbirisinde AFM1 saptayamadıklarını; 1992 yılında HPLC yöntemi ile inceledikleri 52 pastörize süt örneğinin 4'ünde 73-730 ppt arasında AFM1 tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Sütlerdeki AFM1, sütlere uygulanan ısı işleminden etkilenmediği için UHT ve pastörize sütler arasında fark olması beklenen bir durum değildir. Çalışmamızda AFM1 içeriği bakımından pastörize sütler ile UHT sütler arasında bariz bir farklılık görülmemiştir. Bununla birlikte pastörize sütlerdeki ortalama AFM1 miktarı (35.4 ppt) UHT sütlerdekinden (41.2 ppt) nispeten düşük bulunmuştur. Aynı şekilde en yüksek AFM1 miktarı pastörize sütlerde 144 ppt iken UHT sütlerde 161 ppt olarak saptanmıştır. Bu önemsiz farklılık, UHT süt örneklerinden bazılarının muhtemelen çalışmanın başlatıldığı Mayıs ayından önce üretilmiş olmasıyla ilgili olabilir.

Elde edilen bulgular, incelenen içme sütlerinde AFM1 miktarlarının nispeten yüksek çıkması insan sağlığı açısından bir tehlikeye işaret etmekle birlikte bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılması, bilhassa süt hayvanlarına yedirilen yemlerde toksijenik küflerin ve dolayısıyla aflatoksinlerin kontrolünün zorunluluğunu ortaya koymaktadır.

Ülkemizde çiğ sütler üzerinde yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bunlardan birisinde Bakırcı (2001), çalışmamızdakine benzer şekilde incelenen 90 çiğ süt örneğinden 79'unda (% 87.7) AFM1 bulunduğu; pozitif örneklerden 35'inde (% 44.30) bu toksinin 50 ppt'den yüksek olduğu rapor edilmiştir. Özkaya ve ark. (2003)'nin çalışmasında ise ülkenin 30 ayrı bölgesinden toplanan toplam 543 çiğ süt örneğinin 206'sında (%37.9) AFM1 bulunduğu; 82'sinde (% 15.1) yasal limitin aşıldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar AFM1 miktarı ve insidensi açısından bölgeler arasında önemli farklılıklar bulunduğunu rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada Oruç ve Sonal (2001) ise aksine Bursa bölgesinden Ağustos ayında toplanan çiğ süt örneklerinde ELISA tekniği ile yapılan incelemelerde AFM1 insidensi % 10 olarak belirlenmiş ve hiçbir numunenin 50 ng/L üzerinde toksin içermediği bildirilmiştir. Son çalışmada saptanan değerlerin düşük olması mevsimsel faktörlerle ilgili olabilir.

Nitekim mevsimsel faktörlerin sütlerdeki AFM1 insidensi ve miktarı üzerine etkili olduğu ve süt hayvanlarının beslenmesiyle ilişkili olarak kış sütlerinin yaz sütlerinden daha yüksek oranlarda AFM1 içerdiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Galvano ve ark. (1998)'nin çalışmasında kış aylarında (Kasım-Nisan) toplanan sütlerdeki AFM1 miktarının yaz aylarında (Mayıs-Eylül) toplanan sütlerdekenden 4 misli daha yüksek olduğu saptanmıştır. Panariti (2001) ise Arnavutluk'ta yaptığı çalışmada yaz ve kış sütlerinin AFM1 içeriğini karşılaştırmış; kış sütlerinin % 33'ünün, yaz sütlerinin % 3'ünün 50 ppt'den yüksek aflatoksin içerdiğini saptamıştır. Araştırmacı, ayrıca AFM1 miktarının yağsız ve yarım yağlı sütlerde tam yağlı olanlara göre daha düşük olduğunu da bildirmiştir. Bakırcı (2001)da

Mart-Haziran ayları arasında 15 günlük periyotlarla analiz ettiği çiğ sütlerdeki AFM1 miktarlarının ilk üç ay içinde birbirine yakın olduğunu, Haziran ayında ise belirgin bir şekilde azaldığını saptamıştır. Blanco ve ark. (1988)'nin çalışmasında da AFM1 pozitif 14 süt örneğinden 4'ünün Mayıs, 3'ünün Kasım, 3'ünün Aralık, diğerlerinin Ocak, Nisan, Temmuz ve Ağustos aylarında elde edilen sütler olduğu saptanmıştır. Buna karşın Markaki ve Melissari (1997) inceledikleri sütlerdeki AFM1 içeriği ile mevsimsel bir ilişki bulamamışlardır.

5. KAYNAKLAR

- APPLEBAUM, R.S., BRACKETT, R.E., WISEMAN, D.W., MARTH, E.H. 1982: Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. *J. Dairy Sci.*, 65(8):1503-1508.
- BAKIRCI, I. 2001. 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
- BLANCO, J.L., DOMINQUEZ, L., GOMEZ LUCIA, E., GARAYZABAL, J.F., GARCIA, J.A., SUAREZ, G. 1988. Presence of aflatoxin M1 in commercial ultra-high-temperature-treated milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(6):1622-1623.
- COLE, R.J., COX, R.H. 1981. Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
- EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. 1994. The Toxicology of Aflatoxins. Academic Press, New York. pp383-426.
- GALVANO, F., GALOFARO, V., DE ANGELIS, A., GALVANO, M., BOGNANNO, M., GALVANO, G. 1998. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy. *J. Food Prot.*, 61(6):738-741
- GALVANO, F., GALOFARO, V., RITIENI, A., BOGNANNO, M., DE ANGELIS, A., GALVANO, G. 2001. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Addit. Contam.*, 18(7):644-646
- HSIEH, D.P.H. 1989. Carcinogenic potential of mycotoxins in foods. In: *Food Toxicology, A Perspective on the Relative Risks*. Eds. S.L. Taylor and R.A. Scanlan, pp. 11-30. Marcel Dekker, Inc., New York.
- KIM EK, SHON DH, RYU D, PARK JW, HWANG. HJ, KIM YB 2000. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit. Contam.*, 17(1):59-64
- LOPEZ, C., RAMOS, L., RAMADAN, S., BULACIO, L., PEREZ, J. 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 211-215.
- LOPEZ, C., RAMOS, L., RAMADAN, S., BULACIO, L. 2003. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*, 14: 31-34.
- MARKAKI, P., MELISSARI, E. 1997. Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. *Food Addit. Contam.*, 14(5):451-456
- MARTINS, M.L., MARTINS, H.M. 2000. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food. Addit. Contam.*, 17(10): 871-874
- MARTLBAUER, E. TERPLAN, G. 1985. A highly sensitive enzyme immunological method of detection of aflatoxin M1 in milk and milk powder. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 36:53
- ORUÇ, H.H., SONAL, S. 2001. Determination of aflatoxin M1 levels in cheese and milk consumed in Bursa, Turkey. *Vet. Hum. Toxicol.*, 43 (5): 292-293
- OZKAYA, Ş., BAŞARAN, A., TOPUZ, F., AKDEMİR, Ç. 2003. Türkiye'de üretilen sütlerde aflatoksin M1 aranması. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. Bildiri Kitabı*, s. 93-97, İstanbul
- PANARITI, E. 2001. Seasonal variations of aflatoxin M1 in the farm milk in Albania. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 52(1): 37-41
- PEITRI, A., BERTUZZI, T., BERTUZZI, P., PIVA, G. 1997. Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food Addit. Contam.*, 14:341-344.
- PITTET, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an updated review. *Revue Med. Vet.*, 149:479-492.
- PIVA, G., PIETRI, A., GALAZZI, L., CURTO, O. 1988. Aflatoxin M1 occurrence in dairy products marketed in Italy. *Food Addit. Contam.*, 5(2):133-139

- ROTHSCHILD, L.J. 1992. IARC classes AFB1 as class 1 human carcinogen. Food Chem., 34: 6266
- SAĞLAM, Ö.F. 2000. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Türk Gıda Mevzuatı. 2. Baskı. Semih Ofset, Ankara
- SKRINJAR, M., STUBBLEFIELD, R.D., VUJICIC, I.F., STOJANOVIC, E. 1992. Distribution of aflatoxin-producing moulds and aflatoxins in dairy cattle feed and raw milk. Acta Microbiol. Hung., 39(2):175-179
- STOLOFF, L., WOOD, G., CARTER, L. 1981. Aflatoxin M1 in manufactured dairy products produced in the United States in 1979. J. Dairy Sci., 64(12):2426-430.
- SYLOS, DE, C.M., RODRIQUEZ-AMAYA, D.B., CARVALHO, P.R. 1996. Occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. Food Addit. Contam., 13(2):169-72.
- UĞUR, M., NAZLI, B., BOSTAN, K. 2001. Gıda Hijyeni. Teknik Yayınları. İstanbul.
- VAN EGMOND, H.P. 1939. Mycotoxins in dairy product. Elsevier App.Sci., London
- VESELY, D., VESELA, D. 1983. Determination of aflatoxin M1 in milk and proof of its toxicity in chick embryos. Vet. Med. (Praha), 28(1):57-61.