

**T.C
TUNCELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TUNCELİ BÖLGESİNDE SATIŞA SUNULAN GELENEKSEL ŞAVAK TULUM
PEYNİRLERİNİN *CRONOBACTER* SPP. YÖNÜNDEN İNCELENMESİ, 16S rRNA DİZİ
ANALİZİ İLE ALT TÜR BELİRLEMESİ VE SUŞLARIN ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİĞİNİN SAPTANMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mehmet KARATAŞ**

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ
Doç. Dr. Ahmet KOLUMAN**

MAYIS-2014

**T.C
TUNCELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TUNCELİ BÖLGESİNDE SATIŞA SUNULAN GELENEKSEL ŞAVAK TULUM
PEYNİRLERİNİN *CRONOBACTER* SPP. YÖNÜNDEN İNCELENMESİ, 16S rRNA DİZİ
ANALİZİ İLE ALT TÜR BELİRLEMESİ VE SUŞLARIN ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİĞİNİN SAPTANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet KARATAŞ

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :
Tezin Savunulduğu Tarih :**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ (T.Ü)
Doç. Dr. Ahmet KOLUMAN (UGRL)**
**Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ali ARSLAN (T.Ü)
Yrd. Doç. Dr. Alper GÜVEN (T.Ü)**

MAYIS-2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	I
SUMMARY.....	II
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IV
TABLolar LİSTESİ.....	V
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Peynirlerin Sınıflandırılması	4
1.2. Dünya’da Peynir Üretimi.....	5
1.3. Türkiye’de Peynir Üretimi.....	6
1.4. Tulum Peyniri ve Çeşitleri.....	6
1.5. Peynirlerden Kaynaklanan Sağlık Riskleri.....	10
1.5.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	11
1.5.2. <i>Salmonella</i>	11
1.5.3. <i>Escherichia coli</i>	12
1.5.4. <i>Staphylococcus auerus</i>	12
1.6. <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.)	13
1.6.1. Tarihçe	13
1.7. <i>Cronobacter</i> spp.....	13
1.7.1. Özellikleri.....	14
1.7.2. Gıdalarda bulunuşu.....	14
1.7.3. Neden Olduğu Hastalıklar.....	14
1.8. Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı.....	15
1.9. Antibiyotik Kalıntılı Sütler.....	15
1.10. Antibiyotik Dirençliliğin Önemi.....	16
1.11. 16S rRNA Gen Sekans Analizi.....	17
2. MATERYAL ve METOT.....	19
2.1. Materyal.....	19
2.1.1 Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması.....	19
2.1.1.1. Tamponlanmış Peptonlu Su(Oxoid CM1049/Benzeri Ticari Besiyeri)19	
2.1.1.2. Modified Lauryl Sulphate Broth + Vancomycin Supplement	

	(5mg)(Oxoid SR0247E/ Benzeri Ticari Reaktif).....	20
2.1.1.3.	Kromojenik <i>Cronobacter sakazakii</i> İzolasyon Agar (ESIA) (Oxoid CM1134 / Benzeri Ticari Besiyeri)	20
2.1.1.4.	Kromojenik <i>Cronobacter sakazakii</i> agar (DFI Formülasyonu).....	20
2.1.1.5.	Kundrat Agar.....	20
2.1.1.6.	Tryptic Soya Agar (TSA)(Oxoid CM0131/ Benzeri Ticari Besiyeri).	20
2.1.1.7.	Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437).....	21
2.1.1.8.	BHI Broth.....	21
2.1.2.	Doğrulama.....	21
2.2.	Metot	21
2.2.1	Örneğin Muhafazası.....	22
2.2.2.	Numune Hazırlama.....	23
2.2.3.	<i>Cronobacter</i> spp. İzolasyonu.....	23
2.2.4.	API 20 E Biyokimyasal Testi Kiti ile İdentifikasyon.....	23
2.2.5.	Referans Kültür.....	25
2.2.6.	Antibiyotik Dirençlilik.....	25
2.2.7.	Tulum Peynirinde Toplam Antibiyotik Kalıntısının Saptanması....	25
2.2.8.	16s rRNA dizi analizi ile <i>Cronobacter</i> spp. Tiplendirilmesi.....	26
3.	BULGULAR.....	27
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
5.	ÖNERİLER.....	41
	KAYNAKLAR.....	43
	ÖZGEÇMİŞ.....	49

ÖNSÖZ

Bu tezin planlanması, yürütülmesi ve ortaya konmasında tüm yüksek lisans öğrenimim boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ' ye teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Çalışmada kullanılan Şavak Tulum Peyniri örneklerinin laboratuvar ortamında analizinde bana her türlü desteği sağlayan Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı (UGRL) personeline ve her türlü bilgisini aktarıp bana yol gösteren danışmanım sayın Doç. Dr. Ahmet KOLUMAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, bana her zaman güç veren sevgili eşim Miray KARATAŞ' a sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Mehmet KARATAŞ
Tunceli-2014

ÖZET

Bu çalışmada Tunceli ve ilçelerinde piyasada satışı sunulan (Tunceli-Merkez, Hozat, Mazgirt, Ovacık, Pertek, Pülümür ve Çemişgezek) toplanan 250-300'er gramlık 100 Şavak tulum peyniri örneği kullanılmıştır. Tulum peynirlerinde *Cronobacter* spp. analizi yapılmış ve elde edilen izolat tiplendirilmesi için 16s rRNA dizi analizi kullanılarak 100 örneğin 7'sinin *Cronobacter sakazakii*, 1'inin *Cronobacter muytjensii* ve 1'inin de *Cronobacter malonaticus* olduğu belirlenmiştir. Tiplendirilen izolatın antibiyotik dirençliliği belirlenmiş ve aynı zamanda peynirlerde antibiyotik kalıntısı Kundrat yöntemi ile analiz edilmiştir.

Çalışmanın sonuçlarına göre 100 adet örneğin üçünden (%3) izole edilen ve 16srRNA dizi analizi olarak tanımlanan *Cronobacter sakazakii*'nin CLSI standartlarına göre sefalotine dirençli olduğu bulunmuştur. Tulum peyniri örneklerinden üçünde (%3) antibiyotik kalıntısı gözlemlenmiştir.

Çalışmanın sonuçlarının da gösterdiği gibi gerekli hijyen tedbirlerinin alınmadığı geleneksel üretim sonucunda koliformların üremesi gözlemlenebilmektedir. Bu kapsamda gerekli hijyen eğitiminin verilmesi ve peynir üretiminde meydana gelen bulaşmalardan kaynaklanabilecek riskler hakkında üreticinin bilgilendirilmesi ve farkındalık yaratılması önem göstermektedir. Aynı zamanda *Cronobacter* spp. için gerekli risk analizleri yapılmalı ve epidemiyolojik açıdan önem göstermesi halinde yasal düzenlemelerde yer alması halk sağlığı ve toplum refahı yönünden katma değer sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Tulum Peyniri, *Cronobacter* spp, *Enterobacter sakazakii*, Gıda Güvenliği, Halk Sağlığı, Antibiyotik Kalıntısı.

SUMMARY

In this study, 100 Şavak Tulum Cheese samples offered for sale approximately 250-300 gr were collected from Tunceli-Central, Hozat, Mazgirt, Ovacık, Pertek, Pülümür ve Çemişgezek were used. *Cronobacter* spp. analysis were held and using 16S rRNA sequence analysis for typing of isolate obtained was *Cronobacter sakazakii*. 7 of 100 samples were determined to be *Cronobacter sakazakii*, 1 of 100 samples is *Cronobacter muytjensii* and 1 of 100 samples is *Cronobacter malonaticus*. The isolate was defined for antibiotic resistance and were analyzed for antibiotic residue by Kundrat method on cheeses at the same time.

According to the results, *Cronobacter sakazakii* which are isolated from three of the 100 samples (%3) and as typed with 16 srRNA was found to be resistant to cephalothin. Three of the samples of Tulum cheeses (%3) showed in antibiotic residue.

The results of the study underlines that, the necessary hygiene measures are not taken as a result of the traditional production growth of coliforms observed. In this context, it is important to give necessary hygienic education and training the manufacturer about the risks arising from contamination occurring in cheese production and create awareness. At the same time, necessary risk analysis should be done for *Cronobacter* spp. and when it attention to the epidemiological, it should get involved in legislation for public health and welfare of the community will provide added value.

Key Words: Tulum Cheese, *Cronobacter* spp., *Enterobacter sakazakii*, Food Safety, Public Health, Antibiotic Residue.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1 Türkiye’de peynir üretiminin yıllara göre değişimi.....	2
Şekil 1.2 Büyüme faktörlerinin etki mekanizması	3
Şekil 1.3 Şavak tulum peyniri üretim aşamaları.....	9
Şekil 2.1 İşlem akış şeması.....	21
Şekil 3.1 <i>Cronobacter spp</i> teşhisinde kullanılan her iki besiyerine ait görünüm.....	28
Şekil 3.2 Antibiyotik dirençliliğin ölçümü.....	28
Şekil 3.3 Toplam antibiyotik kalıntısı içeren peynirlerin içermeyenlere oranı.....	30
Şekil 3.4 Antibiyotik kalıntısı tespit edilen petri kabı.....	30
Şekil 3.5 Tulum peynirinden izole edilen <i>C. sakazakii</i> suşlarının BLAST Nükleotid veri tabanında sekans analiz sonuçları.....	32
Şekil 3.6 Elde edilen suşların BLAST veri tabanında identifikasyonunu gösteren sonuç tablosu.....	33

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1 Peynir sınıflandırmasında dikkate alınan nitelikler.....	4
Tablo 1.2 Kuru maddede yağ miktarına göre peynir sınıfları.....	5
Tablo 1.3 Dünyadaki peynir üretimi miktarları (2006).....	5
Tablo 1.4 Türkiye’de çeşitli yörelerde üretilen belli başlı tulum peyniri çeşitleri ve başlıca üretim yöreleri.....	9
Tablo 2.1 Tunceli ilçelerinden alınan tulum peyniri örneklerinin dağılımı.....	19
Tablo 2.2 API 20E değerlendirme tablosu	24
Tablo 3.1 Çalışmada izole edilen <i>Cronobacter</i> spp. ilçelere göre dağılımı	27
Tablo 3.2 Çalışmada izole edilen farklı <i>Cronobacter</i> spp. ilçelere göre dağılımı.....	27
Tablo 3.3 Kullanılan antibiyotikler ve izolatlarda ölçülen çaplar(mm).....	29
Tablo 3.4 Sekans sonuç tablosu.....	33
Tablo 3.5 Filogenetik bağlantı.....	33

KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik asit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü)
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik asit
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincirleme tepkimesi)
TPS	: Tamponlanmış Peptonlu Su
BHI	: Brain Heart Infusion
ATCC	: American Type of Culture Collection (Kalite Kontrol Suşu)
mLSTV	: Modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth Vancomycin
TSA	: Tryptic Soya Agar
BLAST	: Basic Local Alingment Search Tool
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

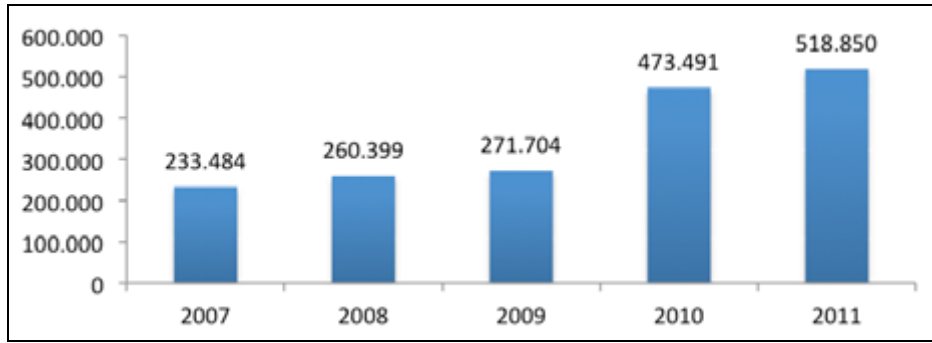
1. GİRİŞ

Hayvansal bir gıda olan peynir, temel besin maddelerinden protein, yağ, mineral maddeler ve bazı vitaminler yönünden zengin bir gıdadır. Bundan dolayı besin değeri çok yüksek ve ayrıca sindirimi de kolaydır. Hemen her çeşit sütte (koyun, keçi, inek, manda) yapılan peynir, özellikle protein, vitamin ve mineral bakımından zengin bir kaynaktır (Demirci, 1990). Bu bağlamda sağlıklı ve dengeli beslenme açısından peynir, diğer süt ürünleri arasında önemli bir yere sahiptir (Bayar, 2008). Beslenmede oldukça önemli yer tutan peynirin dünyada 4000 (Steele ve Ünlü, 1992), Ülkemizde de 130'dan fazla çeşidi bulunmaktadır (Çalim, 2007).

Dünyada peynir üretiminin yılda, yaklaşık 17 milyon ton olduğu ve % 4 düzeyinde arttığı tahmin edilmektedir. Günümüzde peynir üretimi, uluslararası ticarete hacmi giderek artan, çok sağlam bir pazara sahiptir. Peynir sanayi, dünyanın her yerinde çok gelişmiş bir teknolojiye sahip olup, çeşitliliği artmıştır (Çetinkaya, 2005). Üretilen peynirlerin % 85'inden fazlasını sırası ile beyaz peynir, kaşar peyniri ve tulum peyniri oluşturmaktadır (Tekinşen ve Nizamlıoğlu, 1993). Türkiye'de yaklaşık 300.000 ton peynir üretimi söz konusudur. Üretilen peynirin aynı yıl içerisinde tüketildiği varsayılırsa, ülkemizde yıllık kişi başına peynir tüketiminin yaklaşık 5 kg olduğu tahmin edilmektedir (Coşkun 2003).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2010 yılından itibaren süt ve süt ürünleri istatistiklerini aylık olarak ve temel süt ürünleri (içme sütü, peynir, yoğurt, ayran) olarak bildirmeye başlaması ve kategorilerin 2010 yılı ve öncesi yayımlanan kategoriler ile eşleşmemesi nedeniyle süt üretiminde % 8,5'lik bir artış olurken peynir üretiminde 2009 ile 2010 yılı karşılaştırıldığında % 74 gibi yüksek oranda bir artış olduğu görülmektedir. Peynir üretiminin genel seyrine bakıldığında ortalama % 4 oranında bir artış olduğu görülmektedir. 2010 yılında toplam arz bir önceki yıla göre % 69 oranında artarak 488.974 ton, toplam yurtiçi kullanım % 77 oranında artarak 451.406 ton olarak gerçekleşmiştir. Bitiş stokları ise % 0,7 oranında artarak 10.800 ton olmuştur. Türkiye'de en çok tüketilen peynir çeşidi beyaz peynirdir. Her yerde bulunmasına rağmen, beyaz peynir Trakya bölgesi'ne mal edilir. Marmara Bölgesi'nde olduğu kadar, Ege ve Orta Anadolu'da da üretilen beyaz peynirin en ünlülerinden biri Çanakkale'nin Ezine ilçesinde üretilen Ezine peyniridir. Ezine peynirini ünlü yapan da keçi ve koyun sütü karışımından yapılmasıdır. En

iyi tanınan peynirlerimizden olan kaşar peyniri, Kars, Erzurum, Muş gibi Doğu illerinde ve Kırklareli, Edirne, Tekirdağ gibi Batı illerinde çoğunlukla koyun sütünden üretilir. Muş, Bayburt, Konya kaşarları ülkemizde olan yöresel peynirlerden bazılarıdır. Taze kaşar peyniri ise inek sütünden üretilen ve 75°C’de haşlanarak üretilen bir peynir çeşididir. Sarımsı beyaz-sarı, hafif tuzlu bir peynirdir. 2010 yılında ithalat bir önceki yıla göre % 15 oranında azalarak 5.191 ton, ihracat ise % 14.8 oranında artarak 26.768 ton olarak gerçekleşmiştir. TÜİK verilerine göre, 2010 yılında 473.057 ton olarak gerçekleşen peynir üretim miktarı 2011 yılında 518.850 tona yükselmiştir. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre Türkiye’de peynir üretimi şekil 1.1 de gösterilmiştir. Bu kapsamda süt ürünleri üretimi ürün bazında değerlendirildiğinde; Türkiye’de genel olarak beyaz peynir, kaşar, lor, Mihaliç (kelle), Çerkez, dil, otlu peynir, Antep, Çeçil ve Urfa peyniri üretimi yapılmaktadır.

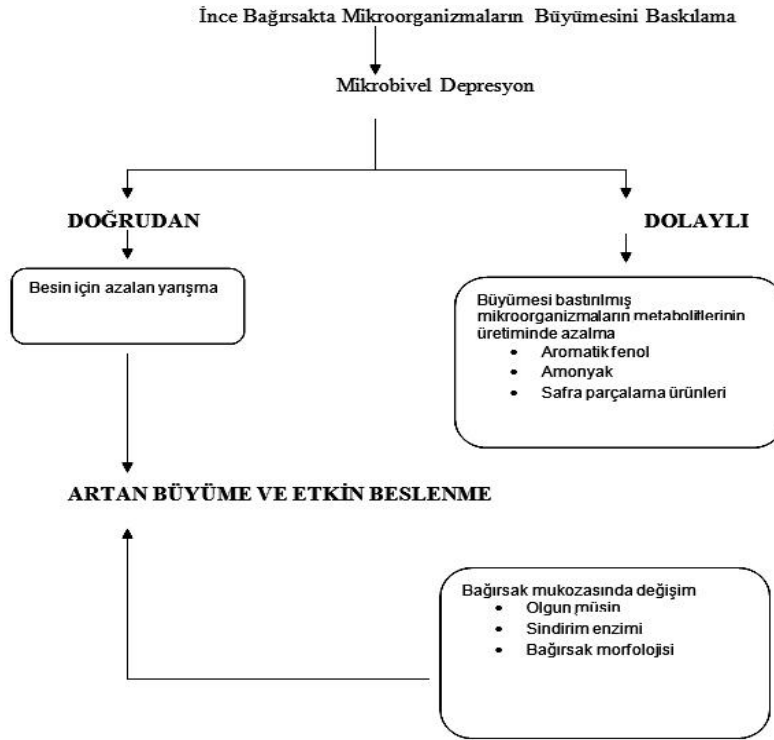


Şekil 1.1 Türkiye’de peynir üretiminin yıllara göre değişimi(TÜİK)

Birçok peynir çeşidinden biri olan Tulum peyniri, karakteristik tat ve aroması nedeniyle tercih edilen özel bir peynirdir (Sert ve Akın, 2008). Ülkemize has bir peynir çeşidi olan Tulum peyniri, diğer peynirlerden daha değişik aromaya sahip olmakla birlikte halen ilkel şartlarda ve küçük mandıralarda üretilmektedir. Tulum peyniri, diğer peynir çeşitlerine göre besin değerinin yüksek olması ve daha değişik lezzet ve aromaya sahip olması sebebiyle ayrı bir öneme sahiptir (Tatlı, 2009).

Antibiyotiklerin çiftlik hayvanlarında büyümeyi destekleyici özellikleri 1940’ların sonlarına doğru keşfedilmiştir. 1950 yılında ABD’nin Stockstad eyaleti, domuz yavrusu ve civciv gibi hayvanların yemlerine küçük bir miktar antibiyotik ilave edildiği zaman büyümenin arttığını doğrulamış ancak, mekanizmanın tam olarak anlaşamadığı bildirilmiştir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi hayvanlar için reçetesiz antibiyotik kullanımını

onaylamıştır (Jones ve Ricke, 2003). Hayvan rasyonları içerisinde antibiyotik kullanımı, yoğun hayvansal üretimin gelişmesine paralel olarak artmıştır. Antibiyotiklerin düşük dozlarda uygulanması kolayca kabul edilerek antibakteriyel büyüme destekleyicileri, hayvancılık sektöründe geliştirilen sistemlerin bir parçası haline gelmiştir (Castanon, 2007). Antibiyotik kullanımına izin verilen koşullar ve ürünler Annex 70/254'te listelenmiştir. Annex I'de tüm Avrupa Birliği'nde pazarlama kısıtlaması olmayan antibiyotikler ve Annex II'de üye devletler tarafından kendi sınırları içerisinde izin verilen antibiyotikler listelenmiştir. Annex II'de listelenen antibiyotikler: basitrasin manganez, neomisin, framisetin, higromisin-B, tilozin ve eritromisin'dir (Kolman ve Dikici, 2013). Büyüme faktörleri mekanizması şekil 1.2' de gösterilmiştir (Anderson vd., 1999).



Şekil 1.2. Büyüme Faktörlerinin Etki Mekanizması (Anderson vd., 1999).

Süt endüstrisinde antibiyotik kalıntıları büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmalar özellikle laktik asit bakterileri gelişmeleri sırasında oluşturdukları enzimlerle ürünün bileşimindeki bazı maddeleri parçalayarak önemli metabolitleri oluştururlar. Süt ve süt ürünlerinde oluşan bu değişiklikler sonucunda ürün kendine özgü karakteristik özelliklerini kazanır. Asit oluşturma, proteoliz ve lipoliz, lezzet ve aroma bileşiklerinin oluşumu ve zararlı bakterilerin gelişiminin önlenmesi kullanılan bu kültürlerin temel işlevleridir.

1.1 Peynirlerin Sınıflandırılması

Peynir yapımında ilk işlem; sütün pıhtılaştırılması veya mayalanmasıyla pıhtılaşmış kazein elde edilmesidir. Üretimin ikinci aşaması, kazeinin sudan arındırılması ve süzülmesi, son aşama ise peynirde istenilen aroma ve tekstürün oluşması için tuzlanması ve olgunlaştırılmasıdır (Çetinkaya, 2005). Peynir sınıflandırması, çeşidinin çok olması ve bazı nitelikler bakımından bir diğerine benzerlik göstermesi sebebiyle oldukça zordur. Bu nedenle, sınıflandırma yapılırken birçok nitelik göz önüne alınır. Peynir sınıflandırılmasında dikkate edilecek başlıca nitelikler Tablo 1.1’de verilmiştir (Çalım, 2007).

Tablo 1.1 Peynir sınıflandırmasında dikkate alınan nitelikler(Çalım, 2007)

Orijin	Ülke, yöre
Süt Nevi	İnek, koyun, keçi, manda
Peynirin Tipi	Koagulasyon metodu (asit, enzim, asit+enzim, konsantrasyon-kristalizasyon)
	Olgunlaşma süresi
	Olgunlaşmada rol oynayan başlıca mikroorganizma tipi
İç Nitelik	Tekstür, renk, gözenek, lezzet maddesi (örn., baharat)
Dış Nitelik	Kabuk, dumanlama, büyüklük, şekil, ağırlık, ambalaj materyali
Kimyasal Bileşim	Kuru maddede % yağ; % en az yağ ve % en fazla rutubet

Türkiye’de peynirler, kuru maddedeki yağ miktarı dikkate alınarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma Tablo 1.2.’de verilmiştir (Tekinşen ve Tekinşen 2005).

Tablo 1.2 Kuru maddede yağ miktarına göre peynir çeşitleri(Tekinşen ve Tekinşen, 2005).

Sınıf	Kuru Maddede Yağ (%)	
	Türkiye	Dünya
Çok yağlı		60'dan fazla
Tam yağlı	45'den fazla	45 – 60 arası
Yağlı	30'dan fazla	25 – 45 arası
Yarım yağlı	20'den fazla	10 – 25 arası
Az yağlı (yavan, yağsız)	20'den az	10'dan az

1.2. Dünya'da Peynir Üretimi

Peynir üretimi dünya çapında büyük bir hayvansal besindir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre 2004 yılında dünya üzerindeki peynir üretimi 17 milyon tondur. Tablo 1.3'te de görüldüğü gibi, peynir üretiminin en fazla olduğu ülke Amerika Birleşik Devletleri'dir. Dünya üretiminin % 30'unu temin etmektedir ve bunu Almanya ve Fransa takip etmektedir (URL-1, 2011).

Tablo 1.3 Dünyada peynir üretim miktarları (URL-1, 2011).

Ülkelerdeki Peynir Üretimi	1.000 Ton
Amerika Birleşik Devletleri	4.275
Almanya	1.994
Fransa	1.858
İtalya	1.154
Hollanda	714
Polonya	579
Brezilya	495
Mısır	462
Arjantin	425
Avustralya	395

1.3. Türkiye’de Peynir Üretimi

Türkiye’de başlıca sütün nevi, yöre ve üretimde uygulanan teknolojik işlemlere bağlı olarak türevleriyle birlikte 130’dan fazla peynir çeşidi bulunduğu ve en çok üretilen peynir çeşitlerinin ise beyaz, kaşar ve tulum peynirleri olduğu bilinmektedir (Çalım, 2007). Türkiye’deki peynir çeşitlerinin tüketimdeki payının % 85-89’unu beyaz salamura, kaşar ve tulum peynirleri, geri kalan % 11-15’ini de çeşitli yöresel peynirler oluşturmaktadır (URL-2, 2011).

Türkiye’de tulum peyniri, Trakya Bölgesi dışında, sıkça yapılan peynir türleri arasında yer almaktadır. Üretim bölgelerine göre Şavak, Divle ve Çimi Tulum peynirleri gibi değişik isimler almaktadır (Kurt ve Öztekin, 1984).

1.4. Tulum Peyniri ve Çeşitleri

Tulum peyniri; ham peynirin ufalanıp tuzlandıktan sonra tulumlara basılması ve belli bir süre olgunlaşması sonucu elde edilen peynir olarak tanımlanmaktadır (Çalım, 2007). Başka bir tanım da; beyaz ve krem renkte, kuru madde ve yağ oranı yüksek, kolay dağılmayan (plastik özellikte), ağıza alındığında eriyerek kendine has tereyağı aroması kolaylıkla hissedilen, yarı sert, homojen tekstürde ve belirgin asidik tatta olan bir peynir çeşididir (Kurt vd., 1991). Tulum peyniri ismini ambalaj malzemesinden (tulumdan) almaktadır (Dağdemir, 1998).

Ekonomik değere sahip olan ve Türkiye’de kaşar peynirinden sonra en çok üretilen peynir çeşididir. Türkiye İstatistik Enstitüsünden alınan bilgilere göre 2004 yılında yıllık olarak üretilen tulum peyniri miktarı 10.000 ton olarak belirlenmiştir (Aydın, 2007).

Tulum peynirleri önceden yöresel olarak ve küçük çapta üretilmekte iken, zamanla her kesim tüketicinin beğenisini kazanması sonucu daha çok miktarlarda üretilmeye başlanmıştır (Akyüz, 1981). Munzur Dağları’nda 3 bin metredeki yaylalarda üretilen ve bin yıllık geçmişi olan tulum peynirinin ambalajlanıp ABD’ye ihraç edildiği vurgulanmaktadır (Aydın, 2007).

Tulum peyniri yaygın olarak Doğu Anadolu Bölgesinde, çoğunlukla da Tunceli, Elazığ, Bingöl, Erzincan ve Erzurum illerinde üretilmektedir. Ülkemizde genelde yöresine

göre isim alan tulum peynirinde örneğin Erzincan yöresinde üretilene “Erzincan Tulum Peyniri” denilmektedir. Divle tulum peyniri, Çimi tulum peyniri, Şavak tulum peyniri gibi yöresel çeşitleri bulunmaktadır (Keleş ve Atasever, 1996).

Tulum peynirinin rutubet oranının % 40’tan fazla olmaması gerekmektedir. Bu yüzden tulum peyniri, yarı sert veya yumuşak peynirler sınıfında yer almaktadır. Tulum peyniri beyaz veya krem renginde, yüksek yağ içerikli, kolay ufalanan, yarı sert tekstürlü tereyağımsı ve keskin kokulu bir peynir çeşididir (Aydın, 2007).

Tulum peyniri üretiminde genellikle koyun sütü kullanılmaktadır. Ancak, zaman zaman inek ve keçi sütü kullanıldığı gibi, bu sütlerin değişik oranlardaki karışımları da kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda peynir yapımında süt pastörize edilmesine karşın; geleneksel olarak üretimde süte herhangi bir ısıl işlem uygulanmadan hemen 28-32 °C sıcaklıklarda mayalanmaktadır. Mayalanma süresi ise maya kuvvetine ve miktarına bağlı olarak 1-4 saat arasında değişmektedir (Koca, 1996).

Türkiye’de tulum peyniri kuru ve salamura olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Kuru tulum peyniri en çok İç, Doğu, Güney ve Güney Doğu Anadolu Bölgeleri’nde, salamura olanı ise Ege Bölgesi’nde kıyıya yakın yerleşim merkezlerinde üretilmektedir (Tekinşen ve Tekinşen, 2005).

Tulum peyniri üretiminde süt pıhtılaştırıldıktan sonra teleme kesilip baskıya alınmaktadır. Baskı işleminde yeterli miktarda sıvı kaybettikten sonra teleme nohut büyüklüğüne kadar parçalanmaktadır. Nohut büyüklüğünde parçalanmış telemeye % 2-3 oranında tuz ilave edilir ve teleme iyice karıştırılır. Teleme tekrar bez torbalara alınıp serin bir ortamda bekletilir. Her gün belirli zaman aralıklarıyla karıştırılan peynir, fazla suyunu salar. Peynir pıhtısı tulumlara sıkı ve hava kalmayacak şekilde basılır. Tulumun ağız kısmına biraz fazla tuz serpilerek, boşluk kalmayacak şekilde tulum dikilir. Daha sonra peynirler mahzen gibi serin yerlerde olgunlaşmaya bırakılır (Kurt, 1994).

Tulum peyniri üretiminde genel olarak koyun sütü kullanılmakta olup, sütlerin mayalama sıcaklığı 26-39 °C arasında değişmektedir. Belirli bir pıhtı işleme tarzı bulunmamakla birlikte teleme birkaç kez parçalanarak bez torbalara konmakta, tuzlama

işlemi telemenin parçalanması esnasında yapılmaktadır. Bazı kaynaklarda telemeye yoğurt katıldığı (Tekinşen vd., 2002), bazen de olgunlaşmayı sağlayacak bakteri sayısını arttırmak ve oksidasyonu sağlamak amacıyla, 18-24 saat havalanmaya maruz bırakılarak ön olgunlaşmaya tabi tutulduğu belirtilmektedir. Tulum sıkıca basılan peynirlerin olgunlaştırma koşulları değişkenlik göstermekle birlikte, genellikle 3-4 °C sıcaklık ve % 70-80 bağıl nemde veya 6-8 °C sıcaklık ve % 75-85 bağıl nemde 3-4 ay olup, isteğe göre taze tüketilebildiği bildirilmektedir (Çalım, 2007).

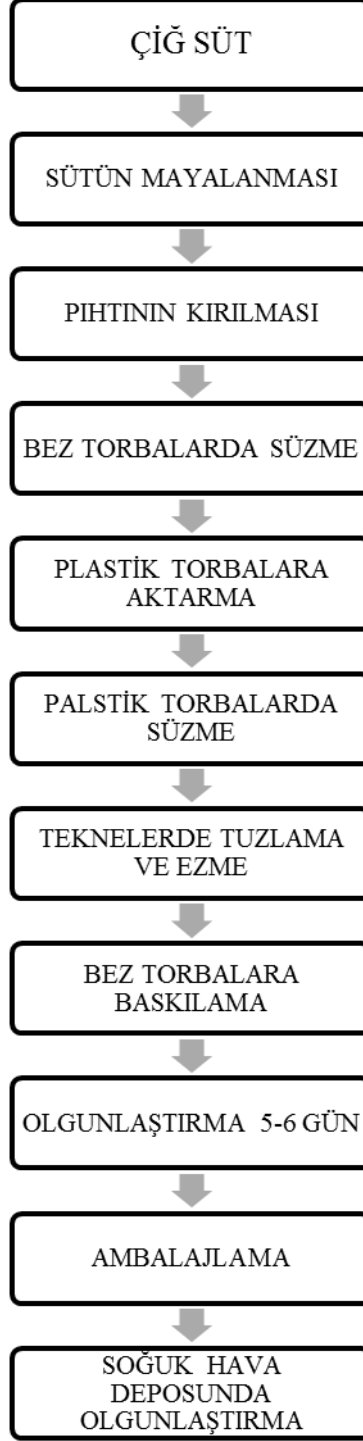
Tulum peynirinde randıman, özellikle yapım tekniğinin ikelliği ve hammaddenin değişik nitelikte olması nedeniyle azdır. Randıman karışık yağlı süttten yapılanlarda ortalama % 12, yavan süttten yapılanlarda da % 9 civarındadır (Tekinşen ve Tekinşen, 2005). Zengin protein, kalsiyum, yağ ve fosfor kaynağı olan tulum peyniri insanların dengeli beslenmesi ve sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (Sert ve Kıvanç, 1984).

Doğu Anadolu Bölgesi'nde; Erzincan, Erzurum, Elazığ, Tunceli ve Bingöl illeri ile bu illerin çevresinde üretilen Şavak Tulum peyniri şu şekilde karakterize edilebilir: beyaz ve krem renkte, kuru madde, protein ve yağ oranı yüksek, kolay dağılmayan, ağızda kendine özgü tereyağı aroması hemen hissedilen, yarı sert, homojen yapıda ve belirgin asidik tatta olan bir peynir çeşidimizdir (Gün ve Güzel, 2011). Ancak Şavak Tulum peynirlerinin üretiminde ne mandıralarda ne de aile işletmelerinde standart bir işleme tekniği uygulanmamaktadır. Alışlagelen usullerle peynir üretilmektedir. Bu durum piyasada satılan peynirlerin çok değişik lezzet ve kalitede olmasına neden olabilmektedir. Bunun nedenleri olarak; üretim tekniğinin yöre ve işletmeye bağlı olarak önemli farklılık göstermesi; peynir üretiminde kullanılan mayanın çeşit, miktar, mikrobiyal yük ve kuvvetçe birbirinden farklı olması; temiz, kaliteli, pastörize edilerek starter kültür ilave edilmemiş, üretim, ambalajlama ve pazarlama ile personel hijyenine gereken önemin verilmeyişi; olgunlaşma şart ve sürelerinin farklılık göstermesi; büyük ambalaja bağlı olarak uzun sürede pazarlama mecburiyeti v.b. faktörler sayılabilir.

Şavak Tulum peyniri, ismini ambalaj malzemesinden almış olmasına rağmen, bugün piyasada satışa sunulan peynirlerin büyük çoğunluğu plastik bidonlar içerisinde. Plastik türü malzemelerin, keçi ve koyun derisinden daha dayanıklı, istenilen hacimde, daha ucuz ve kolay elde edilebilir olma gibi avantajları vardır. Ayrıca düşük de olsa hava-su buharı geçirgenliğinin olması, peynirin olgunlaşması sırasında fazla suyun atılmasına

yardımcı olmaktadır. Ancak bu tür sentetik maddelerin içinde, peynir gibi yağlı ve asitliği yüksek ürünlerin saklanması halinde, birtakım kanserojenik maddelerin gıda maddelerine geçebileceği değerlendirilmektedir.

Şavak tulum peyniri üretiminde genel hatlarıyla şu işlemler takip edilir.



Şekil 1.3 Şavak tulum peyniri üretim aşamaları.

Türkiye’de çeşitli yörelerde üretilen belli başlı tulum peyniri çeşitleri ve başlıca üretim yöreleri Tablo 1.4’te belirtilmektedir.

Tablo 1.4 Türkiye’de çeşitli yörelerde üretilen belli başlı tulum peyniri çeşitleri ve başlıca üretim yöreleri

Tulum Peyniri Çeşidi	Üretim Yöresi
Bez Tulum	Konya Ereğli
Çimi Tulumu	Antalya Akseki, Serik, Manavgat
Deri Tulumu	Malatya, Mersin Anamur
Divle Tulumu	Üçharman (Divle)
Erzincan Tulumu (Şavak)	Erzincan, Tunceli, Elazığ
İvriz Tulumu	Konya Ereğli
İzmir (Salamuralı) Tulum	İzmir ve Çevresi
Kargı Tulumu	Çorum, Çankırı
Küflü Tulumu	Konya, Konya Cihanbeyli
Pastörize Tulum	Balıkesir Ayvalık
Salamuralı Deri Tulumu	İzmir Bergama
Selçuklu Tulumu	Konya
Teneke Tulumu	İzmir Ödemiş, Balıkesir
Tulum	Adana, Antalya, Isparta, Maraş, Ardahan İkizdere, Şırnak Pancarlı, Aydın, Afyonkarahisar, İzmir, Gaziantep, Ankara Gölbaşı

1.5 Peynirlerden Kaynaklanan Sağlık Riskleri

Peynir, bir yandan besin olarak insan sağlığına katkıda bulunurken, öte yandan süttten kaynaklanan çok çeşitli hastalıklar nedeniyle tehlikeli de olabilmektedir. Bu nedenle patojenik mikroorganizmalar veya virüslerle insan sağlığı açısından tehlikeli organik veya inorganik kirleticiler etkisiyle kontamine olabilmektedir. Peynir üretim aşamalarının farklılıklarından ve kullanılan ham maddenin kontamine olmasından dolayı birçok mikroorganizmayı içerebildiği gibi, ek olarak çevresel kontaminasyon konusu olan birçok kimyasalla da kirlenmiş olabilir. Isıl işlem görmeden üretilen peynirler potansiyel halk sağlığı tehlikelerinin oluşmasında etkin rol oynayabilmektedir. Bu kapsamda en fazla gözlemlenen mikroorganizmalar aşağıda özetlenmiştir.

1.5.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria suşlarının insan sağlığı için önemi anlaşılmaya başlandığından beri etken mikroorganizma ile ilgili şüpheli konuları açığa çıkarmak için yapılan bakteriyolojik ve epidemiyolojik çalışmalar hızla artmıştır(Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

Listeria infeksiyonlarının bulaşması açısından önem taşıyan besinlerin başında süt ürünleri gelmektedir. *Listeria* bakterileri içinde en önemli olan tür insanda patojen olabilen *L. monocytogenes*'dir ve bu türün çiğ sütlerden yaklaşık olarak % 5 oranında izole edildiği bildirilmiştir (Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

İsviçre'de yapılan bir çalışmada 429 peynir örneklerinden % 25.6 'sında, peynir üretilen 579 yerden alınan örneklerin % 7.4'ünde ve süt ürünü işleme merkezlerinde çalışan 73 personelden alınan burun kültürlerinde % 4.1'inde *Listeria* izole edilmiştir (Bannerman ve Bille, 1988).

Türkiye'de Tumbay ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 323 peynir örneğinden % 2.1'i *L. monocytogenes* olmak üzere toplam % 5.8'inin *Listeria* spp. türleri ile kontamine olduğu saptanmıştır (Tumbay vd. 1988).

1.5.2 *Salmonella*

Hastalık yapan *Salmonella* türleri, yakın zamanda, pek çok serovarı olan *Salmonella enterica* adlı tek bir tür olarak yeniden sınıflandırılmıştır. *Salmonella Typhi* tifoya neden olmaktadır. Diğer *Salmonella* türleri sıkça gıda kaynaklı hastalıkların nedenidir, özellikle kümes hayvanları ve çiğ yumurtadan kaynaklanır (Brisabois vd. 2007).

İnsan ve hayvanların dışkısı, su ve gıdaların lağım suyu ile kontaminasyonu ile bulaşabilmektedir. Aniden ortaya çıkıp kısa sürede iyileşen gastrointestinal problemlere yol açtığı tespit edilmiştir. İnsanlarda tifo ve paratifo gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu bakteriye karşı gıdaların yeterli süre ısı işlem görmesi veya fermentasyona uğraması gerekmektedir. Çiğ süt veya yetersiz pastörize edilmiş süt ile üretilen dondurma ve peynir çeşitlerinde bulunabilir (URL-3, 2011).

1.5.3 *Escherichia coli*

İnsanlarda diyareye neden olan *E. coli* suşları 2. Dünya Savaşı'ndan sonra ortaya çıkarılmıştır. Bu tarihe kadar düşük virülansa sahip olduğu ve idrar yolları enfeksiyonlarına neden olabildiği kabul edilen *E. coli*'nin diyare etmeni olarak tanımlanması ile bu bakteriye bakış değişmiştir. Bugün insanlarda diyareye neden olan *E. coli* serotipleri patojenik, enteropatojenik, enterovirulent, diyarejenik serotipler olarak adlandırılmaktadır.(Brüssow, 2005)

İshalli hastalıklara neden olan *E. coli* tipleri aşağıdaki gruplara ayrılırlar:

- **Enterotoksijenik *E. coli*** (ETEC) tipleri, enterotoksin üreterek hastalık yapar. Çeşitli toksinler vardır, bazıları bağırsak mukozasına zarar veren *sitotoksik* enterotoksinlerdir, bazıları bağırsak hücrelerinin su ve elektrolit salgılamalarına neden olan *sitotonik* enterotoksinlerdir.
- **Enteroinvazif *E. coli*** (EIEC) tipleri, doku hücrelerinin içine girip çoğalırlar. Bunun yol açtığı enflamasyon tepkisi doku hasarını artırır.
- **Enteropatojenik *E. coli*** (EPEC) tipleri dokuya sıkıca bağlandıktan sonra bir enflamasyon reaksiyonu oluştururlar. Toksin salgılayarak değil, hücre içi sinyalizasyona etki ettikleri için ishale yol açtıkları düşünülmektedir.
- **Enterohemorajik *E. coli*** (EHEC) Bu grupta olanlar Enteropatojenik özellikler taşımaya ilaveten Şiga toksinleri salgılar. Bu gruba ait olanların en ünlüsü *E. coli* O157:H7'nin yol açtığı hastalık hemorajik kolit olarak adlandırılır. İshal az sulu, bol kanlı ve mukuslu olur.
- **EnteroAggregatif *E. coli*** (EAEC), bağırsak epiteline bağlanıp tuğla gibi dizilmiş bakteriler şeklinde görünür. Bu gruba has bakterilerin salgıladığı toksinler mukozaya zarar verip kronik ishale yol açarlar.
- **Diffusely Adherent *E. coli*** (DAEC), bir yaştan küçük çocuklarda ishale yol açar. Özelleşmiş fimbiralar sayesinde seyrek bir şekilde epitele bağlanırlar ve hücre içi sinyal mekanizmasını etkinleştirirler. Bu grup hakkında az şey bilinmektedir.

1.5.4 *Staphylococcus aureus*

Peynirlerden kaynaklanan stafilokokal gıda zehirlenmeleri tüm dünyada yaygın olarak karşılaşılan önemli bir sorundur. Yüksek miktarda *S. aureus* içeren sütlerin

pastörize edilmeden peynire işlenmesi, kullanılan starter kültür aktivitesinin yetersiz olması, sütün pastörizasyon sonrası kontaminasyonu ile ürünün işlenmesi ve depolanması sırasındaki uygun olmayan şartlar peynirlerde bu problemlerin oluşmasına neden olmaktadır (Küçükçetin ve Milci, 2008).

1.6 *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.)

E. sakazakii enfeksiyonlarının özellikle toz bebek mamalarından kaynaklandığı ifade edilmektedir. *E. sakazakii* et, sebze, peynir, tohum, kuru ot, baharat olmak üzere birçok gıdada tespit edilmiştir (Iversen ve Forsythe, 2004).

Amerika ve Avrupa’da kontamine toz bebek maması ile ilişkili 5 adet *E.sakazakii* salgını rapor edilmiştir. *E.sakazakii*’nin toz bebek maması üretiminin pastörizasyon prosesinde canlı kalamadığı ancak bu ürünün pastörizasyonu takiben yapılan besin bileşenlerinin eklenmesi ve rekonstitüsyon işlemleri sırasında kontamine olduğu belirtilmektedir (Toğay vd. 2008).

1.6.1 Tarihçe

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *E. sakazakii*, ilk başlarda *Enterobacter cloacae*’nin sarı pigment oluşturan bir varyantı olduğu düşünülse de 1980’de *E. sakazakii* ile *E.cloacae* arasındaki DNA-DNA hibridizasyon, biyokimyasal reaksiyonlar, sarı pigment oluşturan koloniler ve antibiyotik duyarlılığındaki farklılıklardan dolayı *E. sakazakii* yeni bir tür olarak tanımlanmış (Toğay vd. 2008) ve katkılarından dolayı Japon Bakteriolog Richi Sakazakii’nin adı verilmiştir.

Bu bakterinin yeni doğanlarda sebep olduğu ölüm oranının yüksekliği nedeniyle, Yunan mitolojisindeki yeni doğan bebekleri yutan “*Cronos*” adındaki tanrıdan esinlenerek *Cronobacter* adı verilmiştir. Günümüz bilimsel literatüründe, bakteri tanımlanırken hem *Cronobacter* spp. hem de *E. sakazakii* ismi kullanılmaktadır.

1.7. *Cronobacter* spp.

Cronobacter spp.’nin doğal yaşam ortamı iyi bilinmemektedir. Etken, su, toprak, sebze gibi başlıca çevresel kaynaklarda bulunabildiği gibi kemirgenler ve sinekler gibi vektörlerle de gıda maddelerine sonradan bulaşabilmektedir (Iversen ve Forsythe, 2003).

E. sakazakii tüm insanlarda hastalık oluşturabilirken, en fazla bağışıklık sistemi zayıf olanları etkilemektedir. Rapor edilen vakalar içerisindeki yaş dağılımı dikkate alındığında, özellikle 1 yaşından küçük bebeklerin diğer yaş gruplarına göre daha fazla risk altında oldukları belirlenmiştir. Rapor edilen salgınlarda, hastalanan bebeklerin % 20'den % 50'lere kadar varan oranlarda olduğu, hayatta kalanlarda ise süregelen sorunların nörolojik rahatsızlıklarla sonuçlandığı açıklanmıştır. Etkenin, özellikle yeni doğanlar ve bebeklerde septisemi, menenjit ve nekrotik enterokolitis gibi hastalıklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Enfeksiyonu takiben yeni doğanların % 20'den fazlasında ciddi nörolojik komplikasyonların geliştiği bildirilmiştir (Kolman, 2011).

1.7.1 Özellikleri

Enterobacteriaceae familyasının tümü oksidaz negatiftir, glikozu fermente eder, fakültatif anaerobtur ve enerji üretim süreçlerinde nitratı nitrite indirgerler. *E. sakazakii*, peritrik flajellalı, hareketli, Gram-negatif, çubuk şekilli bir bakteridir. Optimum üreme sıcaklığı 37-43°C olmasına rağmen, 6-45°C gibi çok geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilme yeteneğindedir (Kolman, 2011).

1.7.2 Gıdalarda bulunuşu

E. sakazakii enfeksiyonlarının özellikle toz bebek mamalarından kaynaklandığı ifade edilmektedir. Bu bakteri bebek mamalarının dışında peynir, et, sebze, hububat, bitki ve baharatlardan da izole edilmektedir.

1.7.3 Neden Olduğu Hastalıklar

E. sakazaki, tüm yaş gruplarında enfeksiyona sebep olmakla birlikte, özellikle, 1 yaşın altındaki bebekler, yaşamlarının ilk 28 gününde olan bebekler, prematüre doğanlar (< 37 hafta), düşük doğum ağırlıklı (2,5 kg'den az), immün sistemi zayıflamış bebekler ve HIV pozitif annelerin bebekleri bu konuda ciddi risk altındadır. Bu risk gruplarında, konjenital anomalilerin yanı sıra, septisemi, hidrosefali ve bakteriyel menenjit gibi enfeksiyonlara sebep olduğu bildirilmiştir. Mortalite oranının % 10–80 arasında olduğu, hayatta kalan vakalarda süregelen nörolojik sonuçların ortaya çıktığı ve hastalığın yetişkinlerde daha hafif seyrettiği bildirilmiştir (URL-4, 2011). Beslenme tepkilerinde zayıflık, irkilmeler, sarılık, nefes alıp vermede zorluk ve değişken ateş olmakla birlikte, bir çok vakada enfeksiyon ile birlikte gelişen menenjit söz konusudur. Ölüm birkaç saat ile

birkaç günlük bir zaman dilimi içerisinde meydana gelebilirken, oranı % 50'lerdedir. Hayatta kalanlarda nörolojik bozukluklar ve santral sinir sistemi enfeksiyonları görülmektedir.(Toğay vd. 2010)

Tedavi amaçlı uygulanan antibiyotik ve benzeri antimikrobiyalere karşı *Cronobacter spp.*' nin de dâhil olduğu patojen bakterilerde direnç gelişimi söz konusu olabilir. Özellikle patojen bakterinin geçmişinde bulunduğu ortama bağlı olarak seleksiyona tabi tutulmuş olabilir. Böylece dirençli suşlar gıda ortamına bulaşmış olabilir. Özellikle hayvan hastalıkları sırasında uygulanan antibiyotiklerin süt ile atılmaları sonucu, peynir yapımında kullanılan sütlerin antibiyotik ile kontamine olması muhtemeldir.

1.8. Hayvanlarda Antibiyotik Uygulamaları

Antibiyotikler, çeşitli hayvan türlerinde birçok hastalığın sağaltımı ve kontrolü amacıyla kullanılmaktadır. Antibiyotikler, veteriner hekimlikte, hastalıkların sağaltımı, hastalıklardan koruma ve verimi artırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Livingston ve Kaya, FAO (Dünya Gıda ve Tarım Örgütü) raporlarına dayanarak hazırladıkları yayınlarda hayvanların % 50'sinin yaşamlarının belli dönemlerinde veya tamamında içme suları ve yemleri ile bu tür ilaçları aldıklarını bildirmektedirler. Antibiyotiklerin bilinçsiz bir biçimde kullanılması sonucunda dirençli bakteri popülasyonları artmakta başta karaciğer, böbrek olmak üzere çeşitli organ ve dokularda birikmektedir. Diğer taraftan süt ve yumurta gibi hayvansal ürünlere geçebilmektedir. Böyle ürünleri tüketen insanlarda, üründeki antibiyotik çeşit veya miktarına bağlı olarak hafif alerjiden başlayarak anafilaktik şoka kadar gidebilen olumsuzluklara yol açtığı gözlemlenmiştir.

1.9. Antibiyotik Kalıntılı Sütler

Laktasyondaki hayvanların antibiyotiklerle tedavisi, sütte kalıntı problemlerine neden olabilir. Sütteki antibiyotik kalıntıları tüketicilerde alerjik reaksiyonlar, bağırsak bozukluğu ve genel olarak bakterilerde direnç problemlerine neden olur. Ayrıca süt ürünlerinin üretiminde bozulmalara neden olabilirler. Gıda kaynağı hayvanlarda veteriner ilaçlarını kontrol etmek için Avrupa Birliği ve Gıda ve İlaç Dairesi sırasıyla her bir madde için özel maksimum kalıntı limitleri veya tolerans düzeyleri belirlemişlerdir. Sütte

antibiyotik kalıntılarının varlığını belirlemek için çiftlikte veya süt dağıtım kanalının her noktasında birçok tarama testi geliştirilmiştir (URL-5, 2011).

1.10. Antibiyotik Dirençliliğin Önemi

Antibiyotik dirençliliği probleminin insan ve hayvan sağlığına olan etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi, tartışılabilmesi bakımından, ileride bu konulara yönelik çalışmaların yapılması büyük önem taşımaktadır. Antibiyotik kullanımına bağlı gelişebilecek riskler konusunda ileride daha uygun risk yönetim stratejilerinin oluşturulması bakımından daha fazla bilgi toplanmalıdır (URL-6, 2011).

Gram pozitif bakteriler uzun yıllar toplumda kazanılmış enfeksiyon hastalıklarının en sık sebepleri olmalarının yanı sıra ilerleyen yıllarda giderek artan oranlarda olmak üzere özellikle son yıllarda Gram negatif bakterilerle beraber hastane enfeksiyonlarının önemli etkenleri haline gelmiştir (Ünal, 2006). Gram pozitif bakteriler de diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi tedavi ya da korunma amacı ile kullanılan antibiyotiklere karşı sistematik bir şekilde direnç gelişmektedir. Penisilin aktif kullanıma girdiği 1940'lı yıllarda *Stafilokok* ve *Pnömokok* gibi tedavisi çok zor sağlanan Gram pozitif bakterilerin bu antibiyotiğe çok duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Penisilin tedavisiyle daha önce hemen hemen % 100 ölümcül seyreden *Staphylococcus* sepsisleri ve % 40 ölümcül seyreden pnömokok enfeksiyonlarından kaynaklanan ölüm kısa sürede önlenebilir hale gelmiş ancak bu başarıyla beraber 20. yüzyılda bile tıbbın önemli sorunlarından biri olan antibiyotiklere direnç meselesi de başlamıştır (Fluit vd. 2001).

Penisilin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra stafilokoklarda penisilin direnci tespit edilmiş ve bu direnç hızla yayılmıştır. Direncin sebebi penisilini parçalayan beta-laktamaz enzimidir. Stafilokoklarda penisilin direncinin hızla yayılmasında kuşkusuz beta-laktamaz enzim sentezini sağlayan genin bir plazmid üzerinde olması ve bu nedenle de genetik bilginin horizontal olarak çok hızlı bir şekilde yayılabilmesinin rolü büyüktür. Metisilin, nafsilin, oxazolyl penisilinler gibi beta-laktamaz enzimine dirençli antibiyotiklerin keşfi ise bu bakterilerin neden olduğu hastalıkların kontrolü bir süre mümkün olmuş, ancak 1961 yılında metisiline dirençli ilk stafilokok İngiltere'de izole edilmiştir. Bu problem İngiltere'ye özgü kalmamış, 1960'ların sonuna doğru Metisiline

dirençli ilk *S. aureus* tüm dünyada tanı ve tedavi güçlükleri sebebiyle problem haline gelmiştir (Göğebakan, 2003).

Stafilokokların aksine Pnömonoklarda penisilin direnci yavaş gelişmiştir. İlk kez 1967 yılında Avusturya'da penisilin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) değeri 100 kez daha yüksek suşlar bildirilmiştir. Daha sonraları MIC değerleri 1000 kez daha yüksek (MIC=6-20µg/ml), çok daha dirençli suşlar dünyanın değişik bölgelerinde tespit edilmiştir (Ünal, 2006). Enterokoklarda ise beta-laktam antibiyotiklere karşı oldukça yüksek direnç değerine sahiptirler. Birbirine yakın özellikleri olan bu üç Gram pozitif bakteri grubunda aynı tür antibiyotiklere karşı direnç gelişimi değişik süreçlerde ve muhtemelen değişik mekanizmalarla olmaktadır (Ünal, 2006).

1.11. 16S rRNA Gen Sekans Analizi

1980'lerde bakterilerin identifikasyonu için yeni bir standart geliştirilmeye başlanmıştır. Bakterilerin genetik kodlarının stabil bir parçasının karşılaştırılmasıyla aralarındaki filogenetik yakınlığının belirlenebileceği ortaya konmuştur (Woese, 1987; Woese vd., 1985). Bakteri genetik bölgesinde bunun için aday genler 5S, 16S ve 23S rRNA ve bu genlerin arasındaki bölgeleri kapsamaktadır. Günümüzde bakteri taksonomisi amacıyla en yaygın olarak kullanılan DNA bölümü 16S rRNA genidir (Bottger, 1989; Tortoli, 2003; Harmsen ve Karch, 2004).

16S rRNA yaklaşımı mikrobiyal taksonomide en geniş çapta kullanılan standart tekniklerden biridir (Woese, 1987). 16S rRNA sekans analizleri iki organizma molekülü arasındaki akrabalığı tür düzeyi ve yukarıdaki kategorilerde ortaya koymaktır. Ancak, aynı türe ait olan organizmalar arasındaki ayırt ediciliği ortaya koyması için tek başına yeterli bir teknik değildir (O'Donnell vd., 1993).

16S rRNA gen sekansı yaklaşık 1550 base pair (bp) uzunluktadır ve değişken, korunmuş bölgelerden oluşur. (Chen vd., 1989). 500 bp uzunluktaki kısım maliyet açısından daha ucuz ve uygulanabilirliği daha kolay olduğu için sekans analizlerinde daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Clarridge, 2004). 16S rRNA gen sekans analiz aşamaları sırasıyla DNA ekstraksiyonu, PCR aşaması, arıtma aşaması, sekans döngüsü, sekans analizi, elektroferogramların değerlendirilmesi ve verilerin yorumlanması aşamalarından oluşmaktadır (Clarridge, 2004).

Basic Local Alingment Search Tool (BLAST), aranan dizi sırasını (nükleotid veya aminoasit) veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizileri ile karşılaştırarak aynı veya en yakın olan dizi sırasının ait olduğu mikroorganizmayı, % benzerlikle veren bir bilgisayar programıdır. BLAST, moleküler biyoloji ile ilgili bilgileri bir kaynaktan toplamayı ve genom verilerinin bilgisayar ortamında analiz edilmesi için bilgisayar programları geliştirmeyi amaçlayarak, 1988 yılında kurulan National Center for Biotechnological Information adlı kuruluş tarafından geliştirilmiş bir veri tabanıdır. Sekans analizi yapılarak aranan bölgenin baz dizisi belirlendikten sonra, bu dizi internet sayfasında bulunan program kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılır. Tarama sonucu, aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceğini, benzerlik yüzdesi ile verir. BLASTN bir nükleotid dizisi ile komplementer diziyi ele alarak nükleotid dizisi veri tabanlarıyla karşılaştırır. Hız amacıyla tasarlanmıştır. Yüksek duyarlılık aranan durumlar için uygun değildir (Polat ve Karahan, 2009).

Çalışmanın amacı Tunceli ve ilçelerinde üretilip satışa çıkarılan Şavak tulum peynirlerinde, *Cronobacter* spp. varlığının incelenmesi, elde edilen suşların 16S rRNA dizi analizi ile tiplendirilmesi ve antibiyotik dirençlilik profillerinin çıkarılmasıdır. Ayrıca çalışmada patojen tespitinde kullanılan 2 besiyerinin (Kromojenik *Cronobacter sakazakii* agar (DFI) ve Kromojenik *Cronobacter sakazakii* izolasyon agar (ESIA)) performansı karşılaştırılmış ve analize alınan peynir örneklerinde antibiyotik kalıntısı aranmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

Bu çalışmada Tunceli ve ilçelerinde piyasada satışa sunulan (Tunceli-Merkez, Hozat, Mazgirt, Nazımiye, Ovacık, Pertek, Pülümür, Çemişgezek) toplanan 250-300'er gramlık toplam 100 tulum peyniri örneği kullanılmıştır. Alınan örneklerin ilçelere göre dağılımı tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Tunceli ve ilçelerinden alınan tulum peyniri örneklerinin dağılımı

Örnek toplanan yer	Alınan örnek sayısı
Merkez	13
Hozat	12
Mazgirt	13
Nazımiye	13
Ovacık	13
Pertek	12
Pülümür	12
Çemişgezek	12
Toplam	100

Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen gıda örnekleri 1-2 saat içerisinde Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı (UGRL)'nda analize alınmıştır.

2.1.1. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

2.1.1.1. Tamponlanmış peptonlu su (Oxoid CM1049 / Benzeri Ticari Besiyeri)

Temel besiyerinden 20 g tartılıp, 1000 ml distile su ile ısıtılarak çözündürüldü. Otoklav sonrası pH 7.2 ± 0.2 olacak şekilde ayarlandı. 225 ml' lik Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) cam şişelere koyuldu. 121°C de 15 dk. sterilize edildi.

2.1.1.2. Modified Lauryl Sulphate Broth + Vancomycin Supplement (5mg)(Oxoid SR0247E/ Benzeri Ticari Reaktif)

Temel besiyerinden 32.3 g tartıldı. 500ml distile su ile ısıtılarak çözüldürüldü. Otoklav sonrası pH 6.8 ± 0.2 olacak şekilde ayarlandı. 121°C de 15 dk. sterilize edildi. Temel besiyeri 50 °C' ye soğutulduktan sonra 1 vial Vancomycin supplement (SR0247E) 2 ml distile suda eritilerek temel besiyerine eklendi. Hazırlanan besiyeri aseptik koşullarda steril tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtıldı.

2.1.1.3. Kromojenik *Cronobacter sakazakii* izolasyon Agar (ESIA, Oxoid CM1134 / Benzeri Ticari Besiyeri)

Temel besiyerinden 27.75 g tartıldı. 1000 ml distile su ile ısıtılarak çözüldürüldü. Otoklav sonrası pH 7.0 ± 0.2 olacak şekilde ayarlandı. 121°C de 15 dk. sterilize edildi. Temel besiyeri 50 °C' ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda steril petri kutularına döküldü.

2.1.1.4 Kromojenik *Cronobacter sakazakii* agar (DFI Formülasyonu)

Enterobactericea Enrichment Broth'a yapılan zenginleştirmeden 10 µl alınarak, çizme yada yayma plaka yöntemi ile önceden hazırlanarak dökülmüş kromojenik *Cronobacter sakazakii* agara ekildi. 35-37 °C 'de 24 saat inkübe edildi.

2.1.1.5. Kundrat Agar

Temel besiyerinden 40.5 gr alındı ve 121 °C'de 15 dk. sterilize edildi. Temel besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda *Bacillus sterotermophilus* süspansiyonu katılarak steril petri kaplarına döküldü.

2.1.1.6. Tryptic Soya Agar (TSA) (Oxoid CM0131/ Benzeri Ticari Besiyeri)

Temel besiyerinden 40 g tartıldı. 1000 ml distile su ile ısıtılarak çözüldürüldü. Otoklav sonrası pH 7.3 ± 0.2 olacak şekilde ayarlandı. 121 °C de 15 dk. sterilize edildi. Temel besiyeri 50 °C' ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda steril petri kutularına döküldü.

2.1.1.7. Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437)

Dehidre besiyeri, 34.0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritildi, otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize edilip, steril Petri kutularına 12.5' er ml döküldü.

2.1.1.8. Brain-heart infusion (BHI) Broth

Yarısı Distile su ile dolu olan bir litrelik kaba 37 g askıya alındı. Yeterince karıştırıldı ve sık çalkalamayla ısıtılarak çözüldü. Tamamen çözülene kadar bir dakika kaynatıldı. Uygun kaplara koyuldu ve 15 dk. boyunca 121 °C'de sterilize edildi. Hazırlanmış besiyeri 4 °C'de muhafaza edildi.

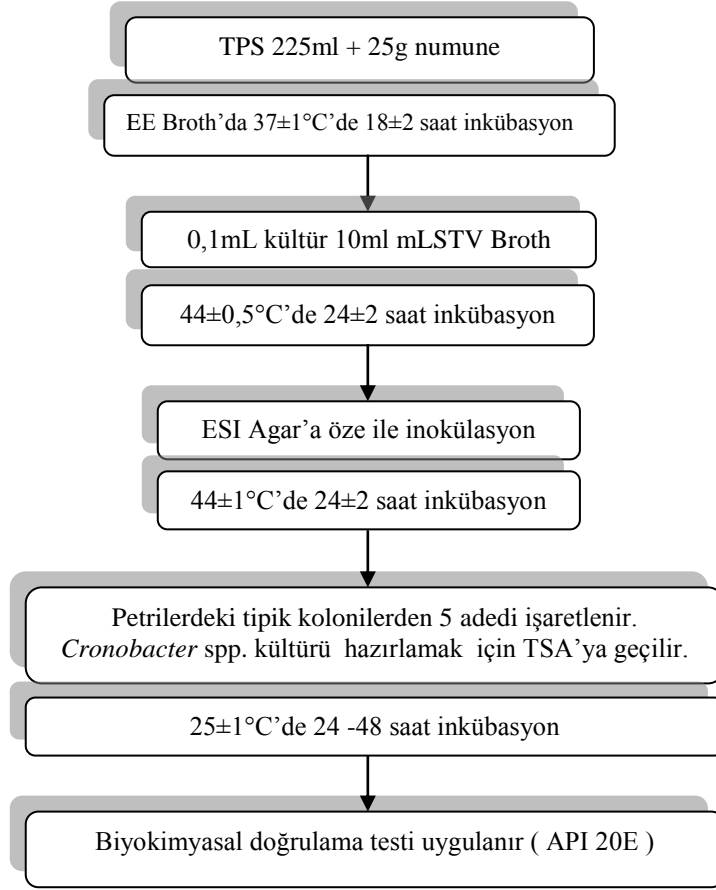
2.1.2. Doğrulama

API 20E (Biomerieux Ref. 20100) kullanılarak yapılmıştır.

2.2. METOT

Cronobacter spp. analizi için ISO 6887 metodu kullanıldı. Alınan örneklerde *Cronobacter* spp. varlığının saptanabilmesi için kullanılan yöntemin kapsamını belirleyen temel basamaklar aşağıdaki şekilde uygulandı. İşlem akış şeması Şekil 2.1' de gösterilmiştir.

- Numunenin Hazırlanması
- Seçici Ön Zenginleştirme
- İnkübasyon
- Seçici İkinci Zenginleştirme
- İnkübasyon
- Katı Besiyerine İnokülasyon
- İnkübasyon
- Değerlendirme (Biyokimyasal Testler)



Şekil 2.1 İşlem akış şeması

2.2.1. Örneğin Muhafazası

- Numune soğuk zincir bozulmadan laboratuvara getirildi ve bekletilmeden analize alındı.
- Numune analize alındıktan sonra kalan kısım + 4 °C' de muhafaza edildi..

2.2.2. Numune Hazırlama

Aseptik koşullarda mevcut numuneyi temsil edecek şekilde 1/10 oranında bir hacim numune, dokuz hacim ön-zenginleştirme sıvı besi yerine aseptik ortamda eklendi (25 g numune 225 ml TPS besiyeri). Numuneler stomacher torbasına aseptik koşullarda alınarak 30 sn karıştırıcıda homojenize edildi.

2.2.3. *Cronobacter* spp. İzolasyonu

TPS'ya tartılarak hazırlanan ön zenginleştirme 37 ± 1 °C'de 18-24 saat inkübe edilerek selektif olmayan ön zenginleştirme yapıldı. TPS de ön zenginleştirmeden 0.1 ml, daha önceden hazırlanılarak tüplere 10 mL olacak şekilde dağıtılmış Modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth Vancomycin (mLSTV)' a aktarılarak 44 ± 0.5 ° C' de 24 saat inkübasyon edilerek ikinci bir zenginleştirme yapıldı.

İnkübasyon sonunda mLSTV'den katı besiyeri olan ESIA Agara ve *Cronobacter sakazakii* Agara (DIF) geçildi. 44 ± 1 °C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu ESIA agardaki 1-2 mm çaplı mavi yeşil koloniler *Cronobacter* spp. için tipik kabul edildi. Benzer şekilde DFI agarda aynı renkli koloniler *Cronobacter* spp. olarak kabul edildi. Her iki agarın performansı değerlendirildi.

İdentifikasyon için DIF ve ESIA'da üremiş olan tipik kolonilerden 5 adedi işaretlendi. Bu tipik kolonilerden 5 adedi Tryptic Soya Agar (TSA)'a inoküle edildi ve 25 ± 1 °C'de 48 saat inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben sarı pigment oluşturan koloniler ileri identifikasyon işlemlerine tabi tutuldu.

2.2.4. API 20 E Biyokimyasal Testi Kiti ile İdentifikasyon

Prensip : API 20 E, 23 standartlaştırılmış ve minyatür hale getirilmiş biyokimyasal test ve bir veri tabanı kullanan, *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram negatif çomaklar için

bir tanımlama sistemidir. API 20 E stripi dehidrate substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. İnkübasyon sırasında metabolizma kendiliğinden ya da reaktiflerin eklenmesiyle ortaya çıkan renk değişimleri oluştururlar. Reaksiyonlar, Okuma Tablosu'na göre okunur ve tanımlama, Analitik Profil İndeksi ya da bilgisayar tanımlama programı kullanılarak elde edilir.

Uygulama : Nutrient agarda zenginleştirilmiş kültürden 1 koloni alarak 5 ml api 20 E süspansiyon mediuma karıştırıldı. Süspansiyon mediumdaki kültür karışımı api 20 E mikro tüplerine (CIT, VP, GEL tüpleri tam, diğer tüpler yarım doldurulur. ADH, LDC, ODC, H₂S ve ÜRE tüpleri 4-5 damla mineral yağ ile kapatılır.) inoküle edildi. Bu mikrotüp profili, içindeki kuyucukları su ile doldurulmuş saklama kabına konuldu. 37 ± 1 °C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda API 20 E değerlendirme tablosundaki işlemler uygulanarak mikrotüplerdeki renk değişimlerinden ve damlatılan reaktiflerin verdiği renk değişimlerine göre sonuçlar +/- şeklinde kaydedildi. Sonuç bilgisayar ortamında değerlendirildi.

Tablo 2.2 API 20E değerlendirme tablosu

TEST	SUBSTRAT	SONUÇ	
		NEGATİF	POZİTİF
ONPG	ONPgalaktozidaz	Renksiz	Sarı (1)
ADH	Arjinin	Sarı	
LDC	Lizin	Sarı	
ODC	Ornitin	Sarı	
CIT	Sitrat	Soluk yeşil-sarı	
H ₂ S	Sodyum tiosülfat	Renksiz- gri	
URE	Üre	Sarı	
TDA	Triptofan	TDA ekle / Derhal sonuç	
		Sarı	Koyu Kahve
IND	Triptofan	JAMES ekle / Derhal sonuç	
		Renksiz- soluk yeşil-sarı	Pembe
VP	Piruvat	VP 1 + VP 2 ekle/ Sonuç 10 dk'da.	
		renksiz	Pembe – kırmızı
GEL	Jelatin	Siyah pigment difuze değil	Siyah pigment difuze
GLU	Glikoz	Mavi yeşil- mavi	Sarı
MAN	Mannitol	Mavi yeşil- mavi	Sarı
INO	İnozitol	Mavi yeşil- mavi	Sarı
SOR	Sorbitol	Mavi yeşil- mavi	Sarı
RHA	Ramnoz	Mavi yeşil- mavi	Sarı
SAC	Sükroz	Mavi yeşil- mavi	Sarı
MEL	Melibioz	Mavi yeşil- mavi	Sarı
AMY	Amigdalin	Mavi yeşil- mavi	Sarı
ARA	Arabinoz	Mavi yeşil- mavi	Sarı
OX	Oksidaz (Haricen)	OX ekle / sonuç 1-2 dk'da	

		renksiz	Eflatun
NO₃-NO₂	NO ₂ (GLU kuyucuğunda)	NIT 1 + NIT 2 ekle / Sonuç 2-3 dk'da	
	N ₂	kırmızı	Sarı
		Zn ekle / sonuç 5 dk'da	
		Kırmızı	Sarı
MOB	Mobilite (Mikroskopta)	Sabit	Kımıldama
McC	MacConkey agar	Üreme yok	Üreme
OF-F	Glikoz fermantasyon	Yeşil	Sarı
OF-O	Glikoz oksidasyon	Yeşil	Sarı

Çok soluk sarı bile pozitif sayılmalı.

24 saat inkübasyon sonucu turuncu renk negatif sayılmalı, Okuma üst kısımda yapılmalı.

2.2.5. Referans Kültür

Pozitif kontrol olarak *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544, *E.coli* ATCC 25922 negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.6. Antibiyotik Dirençlilik

API 20E ile *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) olduğu doğrulanan suş, BHI broth içerisine aktarıldı. 37 °C'de 24 saat inkübasyonu takiben antibiyotik dirençliliği testi için BHI'dan 100 µl sıvı besi yeri Mueller Hinton agara inoküle edildi ve drigalski spatülü ile yayıldı. Üzerine insan ve hayvan sağlığında yaygın olarak kullanılan ampisilin (25µg), amoksisilin (30µg), ciprofloksasin (10µg), tetrasiklin (30µg), oksitetrasiklin (30µg), streptomisin (25µg), gentamisin (30µg) ve sefalotin (30µg) antibiyotik diskleri yerleştirilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edildi ve zon çapları ölçüldü. Ölçümler CLSI (2010) standardına göre yapıldı.

2.2.7. Tulum Peynirinde Toplam Antibiyotik Kalıntısının Saptanması

Kundrat agar üzerine steril pastör pipetinin kalın ucu ile delikler açılmıştır. 1g peynir eppendorf tüplerde aktarıldı ve 1ml steril distile su ile homojenize edildi. Takiben homojenizat santifüj (14000 rpm'de 5 dk.) edildi. En üstte bulunan süpernatanttan 100 ml kundrat agardaki kuyucuklara ilave edildi ve 60 °C'de 3-5 saat inkübasyona bırakıldı. Sarı renk oluşumu, içindeki *Bacillus stercophilus* üremesini gösterdi. Mevcut antibiyotik kalıntısında üreme olmadığından mor renk antibiyotik kalıntısının varlığını belirtmiştir.

2.2.8 16s rRNA sekans analizi ile *Cronobacter* spp. Tiplendirilmesi

TSA'da pigment veren koloniler sekans analizi yapılmak üzere ticari bir firma olan REF-GEN'e hizmet alımı yapılarak gönderilmiştir. Burada yapılan analizler aşağıda ifade edilmektedir:

1-Bakteri Genomik DNA izolasyonu (Qiagen Tissue-Blood kit): Bu amaçla QIAamp DNA Mini Kit ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Silika membran yöntemi ile mekanik homojenizasyona gerek kalmaksızın DNA ekstraksiyonu yapılabilmektedir. Bakteri hücreleri enzimatik olarak parçalanabilmektedir.

2-PCR aşaması: *Cronobacter* spp. 16S rRNA bölgesine spesifik primerlar ile yaklaşık 500 baz çifti çoğaltıldı.

3-Sekans analizi aşaması (Applied Biosystems BigDye v.3.1 cycle sequencing kit): Çoğaltılan PCR ürünleri sekans cihazında floresan işaretli dideoksinükleotidlerle bağlanarak sıralama yapıldı.

4-Sekans analizleri ABI 3100 Genetic Analyzer cihazında sıralanan nükleotidler bilgisayar yazılımı ile okunabilir hale çevrilerek sonuçlar MEGA yazılım kullanılarak benzerlik yapıldı ve komşu-bağlantı yöntemi ile filogenetik ağaç çizildi.

3. BULGULAR

Çalışmada 8 farklı bölgeden toplam 100 numune kullanılmıştır. Örnekler Tunceli-Merkez'den, Tunceli'nin Nazımiye ilçesinden ve Pertek ilçesinden alınmış ve analize tabii tutulan tüm örneklerden toplam 9 adet (% 9) *Cronobacter* spp. izole ve identifiye edilmiştir. Örneklerin ilçelere göre dağılımı tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada izole edilen *Cronobacter* spp. ilçelere göre dağılımı

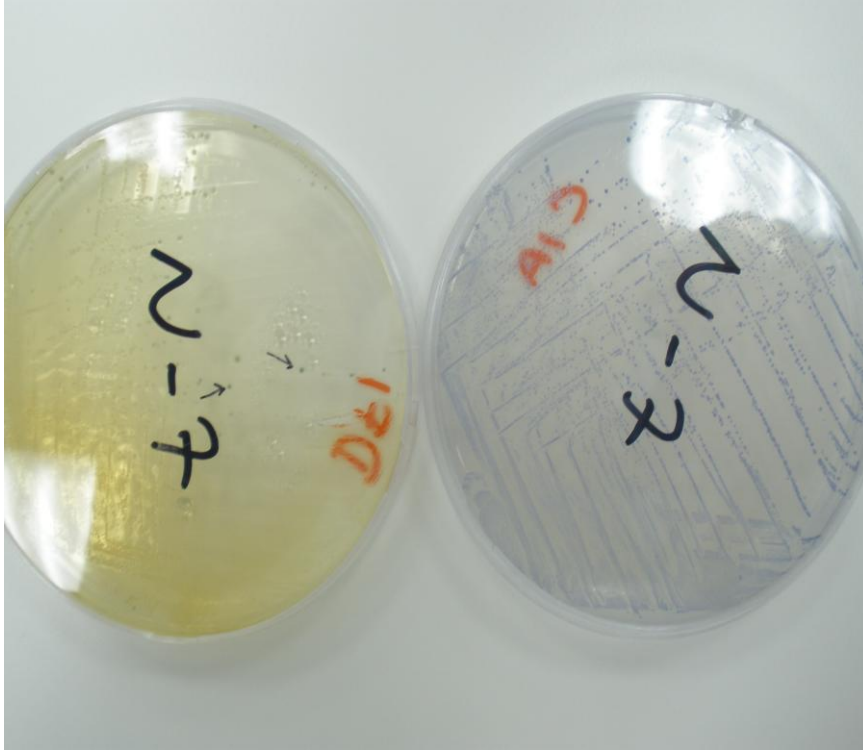
Örnek toplanan yer	Alınan örnek sayısı	<i>Cronobacter</i> spp.	Kontaminasyon seviyesi (%)
Merkez ilçe	13	1	7.69
Hozat	12	1	8.33
Mazgirt	13	0	0
Nazımiye	13	0	0
Ovacık	13	2	15.38
Pertek	12	2	16.66
Pülümür	12	1	8.33
Çemişgezek	12	2	16.66
Toplam	100	9	9

Çalışmada yedi adet *Cronobacter sakazakii*, bir adet *Cronobacter malonaticus* ve bir adet *Cronobacter muytjensii* identifiye edilmiştir. İdentifiye edilen suşların ilçelere göre dağılımı tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada izole edilen farklı *Cronobacter* spp. ilçelere göre dağılımı

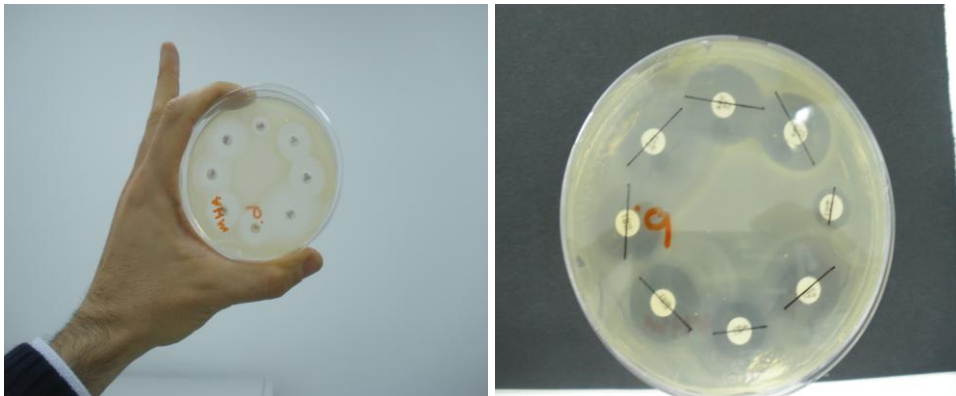
Örnek toplanan yer	Alınan örnek sayısı	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Cronobacter muytjensii</i>	<i>Cronobacter malonaticus</i>
Merkez ilçe	13	1	0	0
Hozat	12	0	1	0
Mazgirt	13	0	0	0
Nazımiye	13	0	0	0
Ovacık	13	2	0	0
Pertek	12	2	0	0
Pülümür	12	1	0	0
Çemişgezek	12	1	0	1
Toplam	100	7	1	1

Analiz amacıyla kullanılan ESIA ve DFI arasında fark olmadığı tespit edilmiştir. CIA ve DFI'de tipik koloni morfolojisi şekil 3.1 de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 *Cronobacter spp.* teşhisinde kullanılan her iki besiyerine ait görünüm

Elde edilen *Cronobacter spp.* antibiyotik dirençliliği yönünden değerlendirilmiştir. Bu kapsamda kullanılan antibiyotikler ve ölçülen çaplar (mm olarak) tablo 3.3'te gösterilmiştir. Antibiyotik dirençliliğin ölçümüne ait görünüm şekil 3.2 de verilmiştir.



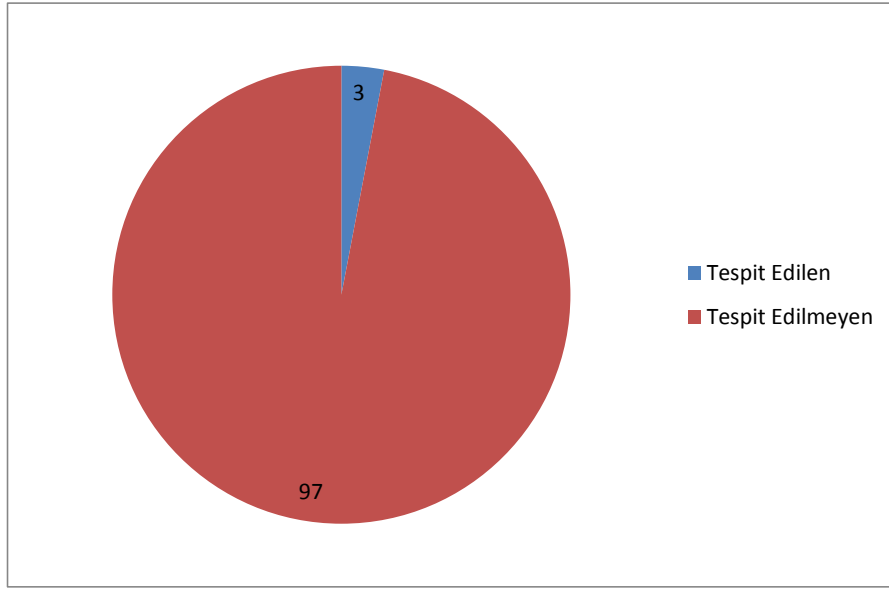
Şekil 3.2 Antibiyotik dirençliliğinin ölçümü

Tablo 3.3 Kullanılan antibiyotikler ve izolatlarda ölçülen çaplar(mm)

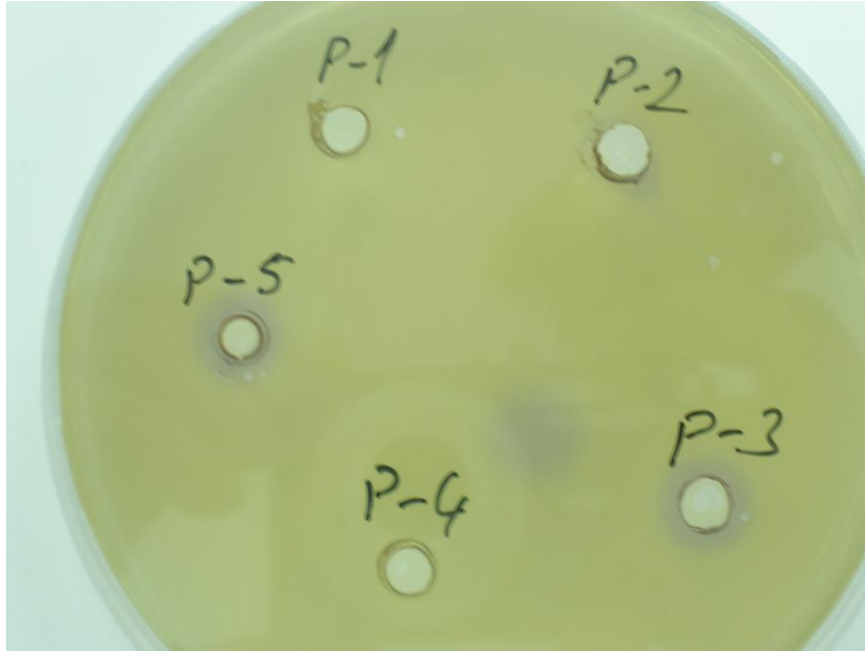
Antibiyotik adı	İzolatlar									Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) göre değerlendirme		
	MRK-8	O-3	O-7	PL-2	CG-5	CG-12	PE-5	PE-11	HO-10	Dirençli	İntermittans	Duyarlı
Ampisilin	21	20	19	24	16	16	24	22	18	8	16	32
Amoksisilin	22	19	19	25	21	20	19	17	23	4	8	16
Ciprofloksasin	20	11	17	15	19	18	17	11	12	1	2	4
Tetrasiklin	18	17	18	14	15	17	19	20	17	4	8	16
Oksitetrasiklin	18	19	17	9	11	17	19	18	20	4	8	16
Streptomisin	14	24	28	21	29	35	17	19	21	4	8	16
Gentamisin	16	22	24	25	27	29	26	25	21	4	8	16
Sefalotin	9	38	37	13	11	33	34	39	38	8	16	32

Tablo 3.3'te görüldüğü üzere suşların tamamı intermitans düzeyde ampisilin direnci göstermektedir. Pülümür ve Çemişgezek örneklerindeki birer suшта intermitans düzeyde tetrasiklin ve oksitetrasiklin direnci kaydedilmiştir. Merkezden alınan örnekten izole edilen suшта streptomisine intermitans düzeyde dirençlilik gözlemlenirken, aynı suшта sefalotin direnci belirlenmiştir. Benzer şekilde Pülümür ve Çemişgezek örneklerindeki birer suшта da sefalotine direnç gözlemlenmiştir.

Peynirlerde toplam antibiyotik kalıntısı analizi de yapılmıştır. Bu amaçla yapılan analizde 100 adet peynirin 3'ünde (% 3) antibiyotik kalıntısı olduğu belirlenmiştir (şekil 3.3). Antibiyotik kalıntısı Tunceli'nin Nazımiye bölgesinden alınan peynirlerde bulunmuştur (Şekil 3.4). Ancak bu peynirlerde *Cronobacter* spp. tespit edilmemiştir.



Şekil 3.3 Toplam antibiyotik kalıntısı içeren peynirlerin içermeyenlere oranı



Şekil 3.4 Antibiyotik kalıntısı tespit edilen petri kabı (P=Peynir)

Cronobacter spp. olarak tanımlanan ve antibiyotik dirençliliği belirlenen suş sekans dizilimi belirlenmek üzere ticari hizmet veren bir firmaya gönderilmiştir. Firmadan alınan sonuçlara göre izolatın *C. sakazakii* olduğu belirlenmiştir. Bakteriye ait sekans dizisi ve BLAST sonuçları şekil 3.5 ve şekil 3.6'da, sonuç tablosu Tablo 3.4'te verilmiştir.

Suşlar arasında yapılan komşuluk ilişkisi ve tür bazında tiplendirmeye bağlı olarak ortaya çıkan filogenetik bağlantılar Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

Bu kapsamda Ovacık örneklerinde tespit edilen izolatların identik olduğu gözlemlenirken benzer Şekilde Pertek örneklerinde tespit edilen izolatların birbirine benzediği ve Pülümür örneklerinde tespit edilen PL-2 kodlu örnekten izole edilen *C. sakazakii* suşu ile Çemişgezek örneklerinde tespit edilen CG-5 kodlu suşlarının birbirine benzediği tespit edilmiştir. Buna karşılık *C. sakazakii* suşlarından Merkez ilçe örneğinin diğerlerinden farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Hozat ve Çemişgezek'te belirlenen iki ayrı suşun farklı türler olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 3.5 Tulum peynirinden izole edilen *C. sakazakii* suşlarının BLAST Nükleotid veri tabanında sekans analiz sonuçları

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - 8VS6T51S013

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

ORNEK-1492R_H04 (1168 letters)

Query ID |cl|6645
Description |ORNEK-1492R_H04
Molecule type |nucleic acid
Query Length |1168

Database Name |nr
Description |All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program |BLASTN 2.2.25+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [Enterobacter sakazakii genome view](#)

[Graphic Summary](#)

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
Transcripts							
NR_044076.1	Cronobacter sakazakii strain ATCC 29544 16S ribosomal RNA, partial sequ	1858	1858	99%	0.0	95%	
NR_044060.1	Cronobacter malonaticus strain E825; CDC 1058-77; API 76-2121 16S rit	1844	1844	98%	0.0	96%	
Genomic sequences [show first]							
JF330130.1	Cronobacter sakazakii strain fmb04 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1862	1862	99%	0.0	95%	
JF330127.1	Cronobacter sakazakii strain fmb01 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1862	1862	99%	0.0	95%	
GU227689.1	Cronobacter sakazakii strain KYU64 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1862	1862	99%	0.0	95%	
GU122193.1	Cronobacter sakazakii strain 05CHPL38 16S ribosomal RNA gene, partial s	1862	1862	99%	0.0	95%	

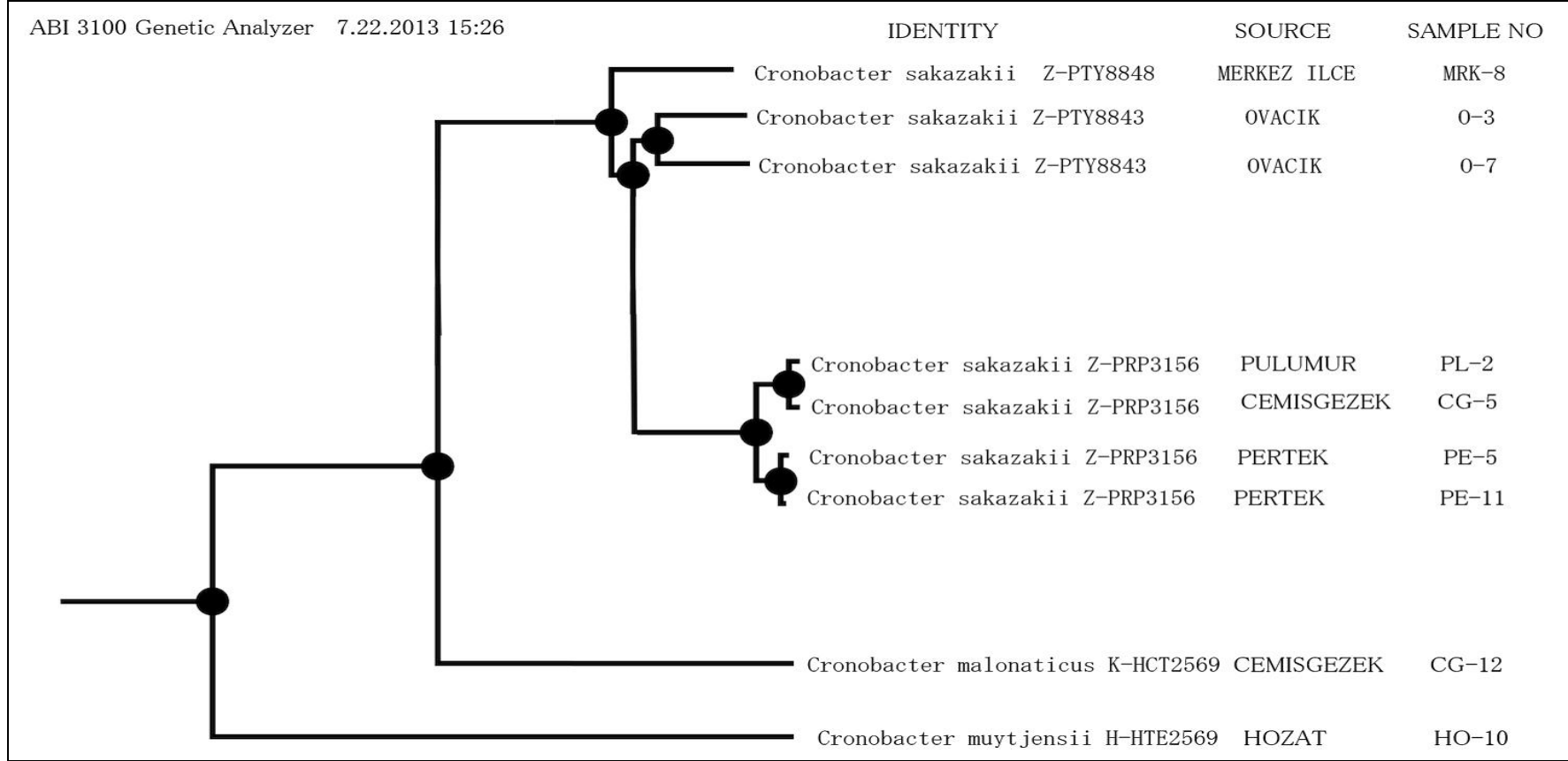
Şekil 3.6 Elde edilen suşların BLAST veri tabanında identifikasyonunu gösteren sonuç tablosu

Tablo 3.4 Sekans sonuç tablosu

ACCESSION	DESCRIPTION	MAX SCORE	TOTAL SCORE	QUERY COVERAGE	E. VALUE	MAX IDENT	LINKS
TRANSCRIPTS							
NR_044076.1	<i>Cronobacter sakazakii</i> strain ATCC 29544 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb EF088379.1 <i>Enterobacter sakazakii</i> strain ATCC 29544 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>1858</u>	1858	99%	0.0	95%	

REF-GEN firmasından alınan sonuçlara göre %95 benzerlik oranında *Cronobacter* spp. Suşunun tespit edildiği Tablo 3.4'te görülmektedir.

Tablo 3.5 Filogenetik bağlantı



Tablo 3.5'te görüleceği üzere Tunceli-Merkez'den ve Ovacık'tan alınan örnekler ile Pülümür, Çemişgezek ve Pertek'ten alınan örneklerden izole edilen *Cronobacter sakazakii* suşları farklılık gösterirken Pülümür, Çemişgezek ve Pertek'ten alınan örneklerden izole edilen *Cronobacter sakazakii* suşları benzerlik göstermektedir. Ayrıca Çemişgezek'ten alınan örnekten *Cronobacter malonaticus* ve Hozat'tan alınan örnekten *Cronobacter muytjensii* izole edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Süt ve ürünleri, mikroorganizmaların bulaşması, beslenmesi ve üremesi yönünden önemli bir gıda olduğundan, sütte bulunan antibiyotikler bulunduğu florada dirençlilik geliştirebilmektedir. Antibiyotiklere karşı gelişen bu dirençlilik, süt her ne kadar çeşitli endüstriyel işlemlerden geçirilse de, yeniden bulaşma riski ve mevcut kontaminasyonun giderilememesi durumu kalıntı yönünden önemli problemlere yol açarak halk sağlığı üzerinde olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Günümüz gıda hijyeni politikaları, gıdalarda patojenlerin bulunmasına ek olarak antibiyotik dirençlilikleri konusunda ve önleyici tedbirler alacak şekilde araştırmalar yapılmasına eğilim göstermektedir.

Demet vd. (1992) Konya bölgesinde 50 adet süt örneğinin 6'sında penisilin-G tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada örneklerin hiçbirinde ampisilin bulunmadığını bildirmişlerdir. Temamoğulları ve Kaya (2010) 120 çiğ süt ve 7 ticari firmadan sağlanan 120 pastörize süttten oluşan toplam 240 adet örnekte ampisilin, amoksisilin, danofloksasin, enrofloksasin, eritromisin, florfenikol ve kloksasilin kalıntı analizi gerçekleştirmiştir. Kalıntı analizlerinde İnce Tabaka Kromatografali (İTK) ve mikrobiyolojik disk difüzyon tekniğine dayalı biyootografik (İTK/Biyootografik) yöntem kullanılmıştır. Sonuçlara göre 1 pastörize süt örneğinde ampisilin kalıntısına rastlanmıştır. 239 örnekte hiçbir antibiyotik kalıntısı belirlenmemiştir. Örneklerin tümünde ampisilin ile kirlenme sıklığı % 0.4 olarak bildirilmiştir. Kaya ve Filazi (2010) Ankara'da satılan çiğ süt ve pastörize süt ürünlerinin antibiyotik kalıntılarının araştırılması amacıyla Nisan 2003 ile Mart 2004 tarihleri arasında, çeşitli satış yerlerinden her ay 10 çiğ süt ve 10 pastörize süt olmak üzere toplam 240 adet süt örneği toplamışlardır. Toplanan örnekler penisilin G, oksitetrasiklin, gentamisin, streptomisin ve neomisin yönünden analiz edilmiştir. Bu amaçla test mikroorganizması olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6633'ün kullanıldığı İnce Tabaka Kromatografisi /Biyootografi yönteminden yararlanmıştır. Buna göre penisilin G, oksitetrasiklin, streptomisin, gentamisin ve neomisin'in en küçük belirlenme miktarları sırasıyla µg/L olarak 4, 100, 200, 100 ve 1000, geri alınma oranları ise yüzde olarak yine sırasıyla 75.6, 79.7, 80.9, 84.7 ve 73.5 olarak belirlenmiştir. Pastörize süt örneklerinin birinde 150.4 İg/L oksitetrasiklin, birinde 33.5 İg/L penisilin G ve bir adet çiğ süt örneğinde 7688.4 µg/L neomisin tespit edilmiş ve bu konsantrasyonların Türkiye ve Avrupa Birliği ülkelerinde sütlerde bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı limitlerinin üstünde olduğu bildirilmiştir. Toplam analiz örneği sayısına göre antibiyotikle kirlenme sıklığı % 1.25 olarak bulunmuştur (Kaya ve Filazi, 2010). Bu çalışmada ise 100 adet tulum peyniri örneğinden 3'ünde (% 3) antibiyotik kalıntısı tespit edilmiştir. Mevcut

kalıntının süttten bulaştığı, bununda koyunlara tedavi amacıyla uygulanan antibiyotik olduğu düşünülmektedir. Antibiyotiklerin vücudu, sütle de terk edebildikleri ve sütlerdeki antibiyotik kalıntılarının bunların teknolojik olarak işlenmesini (yoğurt, peynir yapımı gibi) ciddi biçimde etkilediği bildirilmiştir (Yarsan, 2012). Bazı antibiyotiklerin plazmadakinin birçok katı miktarlarda süte geçebildiği, günlerce, bir yandan tüketici sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek, diğer yandan da sütteki bakteri kültürünü baskılayabilecek miktarlarda sütte bulunabilecekleri bildirilmiştir (Yarsan, 2012).

Peynir, üretim öncesi, üretim sırasında veya sonrasında çevresel bulaşmaya bağlı olarak ve hijyen eksikliği nedeniyle patojenik bakterilerle kontamine olabilmektedir. El-Sharoud ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada 40 peynir örneği analiz edilmiş ve 4'ünde (% 10) *Cronobacter* spp. bulunduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada, 62 peynir analiz edilerek 2'sinde (% 3.2) *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) bulunduğu rapor edilmiştir (Iversen ve Forsythe, 2004). Lehner vd. (2010) İsviçre'de yaptıkları bir çalışmada 100 çiğ süt örneği, 91 süt konsantresi, 172 süt tozu örneğinin sırasıyla % 12, 2.19 ve 4.06'sının *Cronobacter* spp. ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Slovakya'da yapılan bir çalışmada 602 farklı gıda örneğinin 71'inde *Cronobacter* spp. kontaminasyonu bildirilmiştir. Avustralya'da yapılan bir çalışma ile 298 süt tozunun % 32'sinin *Enterobacter sakazakii* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Güney Afrika'da yapılan bir çalışmada 49 süt örneğinin 7 adedi, Çin'de 13 süt örneğinin 8'i, İngiltere'de 195 süt ürünü örneğinin 25'i, İrlanda'da 33 süt tozu örneğinin 17'si *E. sakazakii* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. İngiltere'de yapılan iki farklı çalışmada 823 bebek devam sütü ve 82 süt tozu ile 404 diğer gıda ürünlerinde % 41 oranında *Enterobacter sakazakii* bildirilmiştir (Iversen ve Forsythe, 2004). Türkiye'de yapılan çalışmalarda Şanlıurfa'da 332 süt örneğinin 5'inin ve Diyarbakır'da ise 392 süt örneğinin 13'ünün *E. sakazakii* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Ünal ve Yıldırım, 2010). Bu çalışmada ise Tunceli bölgesinde üretilen peynirlerin % 9'unda *Cronobacter* spp. izole edilmiştir.

Çalışmalarda elde edilen bu farklı sonuçlar, kötü sağlık önlemleri koşullarının, yetersiz veya yanlış pastörizasyon uygulamalarının, pişirme ve pastörizasyon sonrası tekrar bulaşmanın bir göstergesi olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar ürünün tüketici ile buluştuğu noktaya kadar kullanılan alet, ekipman, su, personel ve diğer noktalarda kalite kontrolünün yetersiz olduğunu, kişisel hijyene gereken önemin verilmediğini de ayrıca göstermektedir. Peynirlerde hijyenik kalitenin düzeltilmesi için; özellikle sütün sağımı esnasında hijyenik kurallara uyulmalı; bu amaçla inek memesi sağımdan önce dezenfekte edilmeli ve sonra sağıma başlanmalıdır. Çünkü sütün kontaminasyonu ilk olarak

memeden başlamaktadır. Ayrıca sağımda kullanılan kaplar dezenfekte edilmiş olmalı, aynı şekilde sağımı yapan kişi sağlıklı ve temiz olmalıdır. Özellikle ellerini temiz tutmalıdır. Ayrıca sütün sağıldığı çevreden gelebilecek kontaminasyonların önlenmesi için de süt sağıldıktan hemen sonra sağıldığı yerden uzaklaştırılmalı, serin yerde bekletilmelidir (Uğur 2001).

Cronobacter spp. gentamisine, tetrasikline ve oksitetrasikline direnç göstermektedir. Geleneksel olarak, *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) menenjitte ampisilin ve gentamisin veya ampisilin ve kloramfenikol ile tedavi edilmekte ve ikinci bir ajan olarak yeni nesil sefalosporinler düşünülmesi gerektiği bildirilmektedir. Trimetoprim-sulfametoksazol uygulamalarında faydalı olabildiği bildirilmiştir (Lai, 2001). Farmer ve arkadaşları (1980), bütün klinik *E. sakazakii* suşlarının gentamisine, kanamisine, kloramfenikola ve ampisiline; % 87 yada daha fazlasının nalidiksik aside, streptomisine, tetrasikline ve karbenisiline; % 67-71'inin sulfadiazine ve kolitsine; sadece % 13'ünün sefalotine duyarlı olduğunu rapor etmiştir. Çalışmada kullanılan tüm suşlar penisiline dirençli; sadece 100 suşun 1'inin çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu bildirilmiştir. Muytjens ve Van der Ros-van der Repe (1986), 25 antibiyotik ile test edilen 195 *E. sakazaki* suşunun % 90'ına ait MIC değerlerinin *E. cloacae* için olanlardan en az iki kat daha düşük olduğunu rapor etmiştir. Ancak *E. sakazakii* suşlarının sefalotine ve sulfametoksazola direnç göstermekte oldukları bildirilmiştir. Nazarowski-White ve Farber 1999 yılında, sertifikalı referans (ATCC 29544) suşun, 5/8 gıda ve 8/9 klinik suşun sadece sulpisoksazola ve sefalotine dirençli olduğunu göstermiştir. Diğer üç gıda suşu kloramfenikola dirençli iken, diğer bir klinik suş tüm ajanlara duyarlılık gösterdiği, buna ek olarak kloramfenikola dirençli gıda izolatlarının ikisinin de tetrasikline ve birisinin de ampisiline dirençli olduğu gösterilmiştir. Lai (2001), tüm *E. sakazakii* izolatlarının ampisilin, sefazolin ve genişlemiş spektrumlu penisilinlere dirençli olduğunu rapor etmiş, buna karşılık *E. sakazakii* izolatlarının aminoglikozide ve tritoprim-sulfametoksazola duyarlı olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada tespit edilen izolatın sefalotine dirençli olduğu, ampisilin ve streptomisin'e orta düzeyde dirençli olduğu tespit edilmiştir. Literatürde farklı zaman ve yerlerde tespit edilen *Cronobacter* spp.'lerin antibiyotik dirençliliğinin geniş bir spektrumda olduğu anlaşılmaktadır.

Yapılan farklı çalışmalarda antibiyotik dirençliliğinin ülkelere göre değişkenlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu kapsamda Güney Afrika'da süttten elde edilen 7 izolatın 6'sı sefalotin direnci gösterirken (Witthuhn ve Cameron, 2011), benzer şekilde İngiltere'de

süt ürününden elde edilen 25 izolatın tamamının sefalotine dirençli olduğu bildirilmiştir (Iversen ve Forsthe, 2003). Çin’de süttten elde edilen 8 izolatın tamamının oksasiline dirençli olduğu ortaya konulmuştur. Türkiye’de Şanlıurfa’da süt kaynaklı 5 suşun sefalotine dirençli olduğu buna karşılık Diyarbakır’da yapılan çalışmada suşların tamamının meropenem ve amikasin’e dirençli olduğu bildirilmiştir. Stock ve Wiedemann yaptıkları çalışmada *E.sakazakii*’nin β -lactam antibiyotiklere yüksek duyarlılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Antibiyotiklere karşı tespit edilen dirençteki bu farklılık, ülkelere göre antibiyotik kullanımının farklı prosedürlere bağlı olabileceği düşüncesini akla getirmektedir (Ünal ve Yıldırım, 2010). Bu durum gerek kuru dönemde koruma maksatlı kullanılan antibiyotiklerin, gerekse mastitis tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin tekrar tekrar uygulanmasının mastitis etkeni olan patojenlerin direnç göstermesine neden olduğunu düşündürmektedir.

Şüphesizdir ki antibiyotik dirençliliği yüksek bir gıda patojeninin yaratacağı bir klinik tablo hem sağlık açısından hem de ekonomik açıdan ülkesel boyutta büyük sorun yaratacaktır. Bu kapsamda çalışmanın konusunu oluşturan Şavak Tulum peynirlerinde antibiyotik kalıntısı aranmıştır.

Claridge (2004) fenotipik olarak identifikasyonu zor olan 22 adet veteriner kliniklerinden elde edilen 22 adet bakteri izolatına 1503 bp. içeren 16S rRNA kısımları ile yaptığı sekanslama sonucunda cins düzeyinde % 95 (21/22)’ini tür düzeyinde ise % 86 (19/22)’sını, 16S rRNA’nın 512 bp.’lik V1-2-3 değişken bölgesi (29 bp.-514 bp.) ile yapılan sekanslama sonucunda ise cins düzeyinde % 95 (21/22)’ini tür düzeyinde ise % 73 (16/22)’sını, V7-8-9 değişken bölgesi (1.170 bp.-1.520 bp.) ile yapılan sekanslama sonucunda ise cins düzeyinde % 95 (21/22)’ini tür düzeyinde ise % 41 (9/22)’sını tanımladıklarını bildirmişlerdir. Genbank’a verilen sekans dizilimlerinden cins düzeyinde izolatları tanımlayabilmek için ≥ 95 -99% düzeyinde, tür düzeyinde izolatları tanımlayabilmek için ise ≥ 99 % oranında sekans benzerliğinin olmasının gerektiği bildirmişlerdir. ATCC *Cronobacter sakazakii* ile % 94.7 oranında uyum göstermekte olup, farklılıklar sahada maruz kaldığı strese bağlı olarak yukarı düzenlenen (up regulation) genlerin eksprese ettiği protein değişimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

5. ÖNERİLER

Sonuç olarak Tunceli bölgesinde farklı noktalardan alınan 100 peynir örneğinde *Cronobacter sakazakii* tespit edilmiş olup, söz konusu mikroorganizma koliform grubunda bulunduğundan dolayı süt sağım hijyeni, üretim hijyeni gibi konularda eksiklik olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla üretimde çalışan personele eğitim verilerek, halk sağlığı yönünden risk taşıyan patojen mikroorganizmalar başta olmak üzere üretimde hijyen eksiklikleri üzerine bilgilendirmeler yapılması önerilmektedir. Böylece kalifiye eleman yetiştirilmesinin yanında, olumsuz analiz sonuçları nedeniyle meydana gelen ekonomik kayıplarında önüne geçilebilir. Aynı zamanda çalışmanın konusunu oluşturan örneklerin 3'ünde antibiyotik tespit edilmiş olması, antibiyotik uygulamasını takiben vücuttan atılması için gereken sürenin bilinçli ya da bilinçsiz olarak üretici tarafından uygulanmadığını göstermektedir. Benzer eğitim çalışmalarının üretim personeli ile beraber yetiştiricilere de uygulanmasının, özellikle kalıntı problemleri başta olmak üzere hijyenik problemlerin ortadan kalkmasına fayda sağlayacağı ve işletmelerin kaliteli ham maddeye ulaşmalarını kolaylaştıracağı düşünülmektedir.

Cronobacter spp. yeni adlandırılmasına rağmen eski bir patojen olup halihazırda Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde bebek maması ve devam sütlerinde aranması zorunlu bir mikroorganizmadır. Patojenin peynirden izole edilmiş olması halk sağlığı yönünden risk oluşturabileceğini göstermektedir. Bu konudaki çalışmaların artırılarak yapılacak risk analizleri sonucunda *Cronobacter* spp.'nin Türk Gıda Kodeksi'ndeki yerinin tekrar ele alınması gerektiği düşünülmektedir.

Cronobacter spp. izolasyonunda değişken biyokimyasal testler ile yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik elde edilmekte ve sonuçların tekrar edilmesi güçlük göstermektedir. Bu nedenle *Cronobacter* spp. türlerinin belirlenmesinde 16s rRNA analizinin verimli olduğu ve bu aşamadan elde edilen verilerin süşun birçok özelliğine ait farklı bilgileri içerdiğinden dolayı izolasyonda tavsiye edilmektedir.

Cronobacter spp. ile ilgili çalışmaların sayısının artırılarak halk sağlığı üzerindeki riskler belirlenmelidir. Bu kapsamda süt ürünleri başta olmak üzere riskli tespit edilen ürünlerin işlenmesi esnasında oluşturulan kritik kontrol noktalarındaki kritik limitlerin

hesaplanmasında, *Cronobacter* spp.'nin de dikkate alınması halk sağlığı açısından oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

- Akyüz, N., 1981. Erzincan (Şavak) Tulum Peynirinin Yapılışı ve Bileşimi. Atatürk Üniv. Zir. Fak. Derg. 12 (1): 85-111.
- Anderson DB, McCracken VJ, Aminov RI, Simpson JM, Mackie RI, Verstegen MWA, Gaskins HR. (1999). Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. Nutr Abstr Rev. Series B: Livestock Feeds and Feeding, 70, 101–188.
- Arslan, A., Güven, A., Gönülalan, Z., Özmen, H. 1996. Şavak Tulum Peynirlerinin Mineral Madde Düzeyi, Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Derg. 10 (2): 265-268.
- Aydın, B. D., 2007. Erzincan Tulum Peyniri Üretiminde Alternatif Yöntemlerin Araştırılması, Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Bannerman, S. ve Bile, J. A. 1988. A New and Selective Medium for Isolating *Listeria* from Heavily Contaminated Material. 54: 165-7.
- Bayar, N., 2008. Farklı Ambalaj Materyallerinin Tulum Peynirinin Çeşitli Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi, Van.
- Brackett, R.E. 1988. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. Food Technology. 162-4.
- Brisabois A., Cazin I., Breuil J., Collatz E. 2007. Surveillance of Antibiotic Resistance In *Salmonella*. Eurosurveillance, Volume 2, Issue 3, Article 2.
- Bottger, E.C. (1989). Rapid Determination of Bacterial Ribosomal RNA Sequences by Direct Sequencing of Enzymatically Amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 65: 171– 176.
- Brüssow, H. (2005). Phage Therapy. *Escherichia coli* Experience.
- Castanon, JI. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci*, 86, 2466–2471.
- Chen, K., Neimark, H., Rumore, P., Steinman, C.R., (1989). Broad-range DNA Probes for Detecting and Amplifying Eubacterial Nucleic Acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, 57: 19– 24.
- Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17: 840-862.
- Coşkun, H., 2003. Peynir Teknolojisi Ders Notları, Yüzüncü Yıl Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Müh. Bölümü, Van 99.

- Çakmakçı, S., Şengül, M. ve Çağlar, A., 1995. Karın Kaymağı Peynirinin Üretim Tekniği ve Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri, Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Müh. Bölümü, 20 (4) 199-203.
- Çalım, H.D., 2007. Konya ve Çevresinde Farklı Tip Ambalajlarda Tüketime Sunulan Tulum Peynirlerinin Kalite Nitelikleri, Doktora Tezi, Selçuk Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı.
- Çetinkaya, A., 2005. Yöresel Peynirlerimiz, abp-Academic Book Production, Kars.
- Dağdemir, V., 1998. Erzincan İlinde Tulum Peynirinin İmalat Maliyeti ve Pazarlama Marjının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. 24 (2000) 57-61.
- Demet, Ö., Acet, A., Traş, B., Baş, A.L., Eğilmez, İ. 1992. Konya'da Faaliyet Gösteren Çeşitli Mandıralardan Toplanan Süt Örneklerinde Penisilin G, Ampisilin ve Penisilin V Kalıntılarının Araştırılması. S.Ü.Vet.Fak.Derg. 8,1, 33-35.
- Demirci, M., 1990. Peynirin Beslenmedeki Yeri ve Önemi, Gıda Dergisi, 15(5), 285-289
- El-Sharoud, W.M., O'Brien, S., Negro, C., Iversen, C., Fanning, S., Healy, B., 2009. Characterization of *Cronobacter* Recovered from Dried Milk and Related Products. *BMC Microbiology* 9:24 doi:10.1186/1471-2180-9-24.
- Ercoşkun, A., 1984. Gıda Maddeleri Tüzüğü, HemaY Yayınları.
- Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., & Brenner, D. J., Enterobacteriaceae Study Group (USA). *Enterobacter sakazakii*, New Species of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 569–584.
- Fluit, A.C., Visser, M.R., Schmitz, F.J., 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* Oct; 14(4):836-71.
- Gögebakan, B., 2003. Peynir ve İnsan Örneklerinden Elde Edilen *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması. 20-21
- Gün, İ. ve Güzel Z., 2011 Ülkemizde üretilen tulum peynirleri ve bazı özellikleri.
- Harmsen, D., Karch, H. (2004) 16S rDNA for Diagnosing Pathogens: a Living Tree. *ASM News* 70: 19–24.
- Iversen, C., Forsythe, S.J. ,2003, Risk Profile of *Enterobacter sakazakii*, an Emergent Pathogen Associated With Infant Milk Formula. *Trends Food Sci Technol.* 14:443-454.
- Iversen C., Forsythe S., 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and Other Enterobacteriaceae from Powdered Infant Formula Milk and Related Products. *Food Microbiol.*, 21, 771-777.

- Jones FT, Ricke SC. (2003). Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci*, 82, 613–617.
- Kaya, S. ve Şahal, M. (1989): Besinlerimizdeki ilaç kalıntıları, bunlara ilişkin tolerans düzeyleri, ilaç verilmiş hayvanlarda uyulması gereken kesim öncesi veya sonrası süreleri A.U. Vet. Fak. Derg., 36:325-340.
- Kaya, S.E. ve Filazi, A. 2010. Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 16(Suppl-A):S31-35.
- Keleş, A. ve Atasever, M., 1996. Divle Tulum Peynirinin Kimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Kalite Nitelikleri, *Süt Teknolojisi*, 1(1), 47-53.
- Koca, N., 1996. Çeşitli Starter Kültür Kombinasyonlarının İzmir Teneke Tulum Peynirinin Nitelikleri Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir 1996.
- Koluman, A. ve Dikici A. 2013. Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: Status quo and global trends.
- Koluman, A. 2011. Çeşitli Gıdalardan *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) İzolasyon ve İdentifikasyonu. Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt:6 No:2, 2011 (17-20).
- Kurt, A. ve Öztekin, L., 1984. Şavak Tulum Peynirinin Yapım Tekniği Üzerinde Araştırmalar. *Atatürk Üniv. Zir. Fak. Derg.*, 15 (3-4):65-77.
- Kurt, A., Çakmakçı, S. ve Çağlar, A., 1991. Erzincan Tulum (Şavak) Peynirinin Mikrobiyolojik Özellikleri. *Doğa Vet. Hay. Derg.* 16 (1), 41-50.
- Kurt, A., 1994. Süt Teknolojisi, Atatürk Üniv. Yay No:573, Zir. Fak. Yay. No:257, Ders Kitapları Serisi No:40, 3. Baskı, Atatürk Üniv. Zir. Fak. Ofset Tesisi, Erzurum.
- Küçükçetin, A. ve Milci, S. 2008 Staphylococcus Aerus İle Kontamine Olan Peynirlerden Kaynaklanan Gıda Zehirlenmeleri. *Akdeniz Üniv. Gıda Müh. Bölümü* 33(3):129-135.
- Lai, K.K. 2001. *Enterobacter sakazakii* Infections Among Neonates, Infants, Children and Adults: Case Reports and a Review of the Literature. *Medicine (Baltimore)* 80:113-22.
- Livingston, R.C. (1985): Anrihioric residues in animal deri'edfood. 1. *Assoc. AnaL. Chem.*, 98:966-967,
- Muytjens, H. L. ve Van der Ros-van De Repe, J. 1986. Comparative in-vitro Susceptibilities of Eight *Enterobacter* Species with Special Reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29, 367–370.

- Nazarowec-White, M. ve Farber, J. M. 1999. Phenotypic and Genotypic Typing of Food and Clinical Isolates of *Enterobacter sakazakii*. Journal of Medical Microbiology, 48, 559–567.
- O'Donell, A.G., Falconer, C., Goodfellow, M., Ward, A.C., Williams, E. (1993). Biosystematics and Diversity Amongst Novel Carboxydrotrophic Actinomycetes. Antonie van Leewenhoek, 64: 325-340.
- Polat, M., Karahan A.G. (2009). Multidisipliner Yeni Bir Bilim Dalı: Biyoinformatik ve Tıpta Uygulamaları. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 16(3): 41-50.
- Sert, D. ve Akın, N., 2008. Türkiye'de Bazı Önemli Tulum Peyniri Çesitlerinin Geleneksel Üretim Metotları, Türkiye 10. Gıda Kongresi 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Sert, S. ve Kıvanç, M. 1984. Erzurum Piyasasında Taze Olarak Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerin Hijyenik Kaliteleri üzerine Bir Çalışma, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 15(3-4):79-89.
- Steele, J.L. ve Ünlü, G., 1992. Impact Of Lactic Acid Bacteria On Cheese Flavour Development Food Technol: 128-135.
- Stock, I. ve Wiedemann, B.,2002. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. *Clin Microbiol Infect* 8:564-578.
- Tatlı, D., 2009. Geleneksel Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Tekinşen, O.C. ve Nizamlıoğlu M., 1993. Yeni Bir Peynir Tipi: Selçuklu Tulum Peyniri, Türk Vet.Hek.Derg., 5(5), 34.
- Tekinşen, O.C., Atasever, M., Keleş, A. ve Tekinşen K.K. 2002. Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim ve Kontrol, Selçuk Üniv. Basımevi, Konya.
- Tekinşen, O.C. ve Tekinşen K.K., 2005. Süt ve Süt Ürünleri Temel Bilgiler, Teknoloji, Kalite Kontrolü, Selçuk üniv. Basımevi, Konya.
- Temamoğulları, F. ve Kaya, S. 2010. Ankara Piyasasında Satılan Sütlerde Bazı Antibiyotik Kalıntılarının İnce Tabaka Kromatografisi ve Biyootografik Yöntemle Saptanması. Kafkas Univ. Vet.Fak.Derg. 16(2):187-191.
- Toğay, S. Ö., Bağcı U., Şener A. 2008. *Enterobacter Sakazakii* ve Gıda Endüstrisindeki Önemi, Türkiye 10. Gıda Kongresi 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Tortoli, E. (2003). Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: The New Mycobacteria of the 1990s. *Clin.Microbiol.Rev.*, 16: 319–354.

- Tumbay, E., Seeliger, H.P.R., İnci, R., Coşar, G., Langer, B. 1988. Isolation of *Listeria* from Cheese in Turkey. *Infeks Derg.* 1: 593-8.
- Uğur, A. 2001. Muğla Halk Pazarında Satışa Sunulan Ev Yapımı Peynirlerin Mikrobiyolojik Özellikleri, *Ekoloji Çevre Dergisi*, Cilt:10, Sayı:40, 3-8.
- URL-1, http://www.fao.org/index_en.htm Dünyada Peynir Üretimi, 28 Mayıs 2011.
- URL-2, <http://peynir.wordpress.com/turk-peyniri/>, Maraş Peyniri, 08 Haziran 2011.
- URL-3, <http://www.gidacilar.net/sutte-bulunan-bakteriler>, Çiğ Sütte Bulunan Bakteriler, 18 Eylül 2011.
- URL-4, <http://www.gidateknolojisi.com.tr/n-45-yeni-bir-gen-tasiyici-kesfedildi.aspx>, Toz Bebek Mamalarında *Enterobacter Sakazakii*'nin Önemi, 18 Eylül 2011.
- URL-5, http://veterinerbilimleri.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr_58130.html, Antibiyotik Tedavisi Sonrası Sütte Kalıntı Sorunu ve Bu Sorunun Belirlenmesinde Kullanılan Testler, 20 Eylül 2011.
- URL-6, <http://www.tvhb.org.tr/?p=461>, Antibiyotik Direnci ve Antibiyotiklerin Veteriner Hekimlikte Bilinçli Kullanımı, 20 Eylül 2011.
- Ünal, N. Ve Yıldırım, M., 2010. İneklerin Süt, Meme Başı Derisi ve Burun Mukozalarından İzole Edilen Stafilokok Türlerinin Antibiyotik Direnç Profilleri.
- Ünal, S. 2006 Gram Pozitif Bakterilerde Değişik Antibiyotiklere Karşı Direnç Sorunu, Bakteriyel Direnç Sorunu. Sayfa 1-12
- Witthuhn, R.C. ve Cameron, M. 2011. Phylogeny and Molecular Identification of *Cronobacter* Strains Isolated from South African Food Products. The Stellenbosch University.
- Woose, C.R., Stackebrandt, E., Macke, T.J., Fox. G.E., (1985). A Phylogenetic Definition of the Major Eubacterial Taxa. *Syst.Appl.Microbiol.*, 6: 143–151.
- Woose, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol.Rev.*, 51: 221–271.
- Yarsan, E. 2012. Hayvansal Gıdalarda Kalıntı Sorunu. Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Başkanı.
- Yavuz, M. ve Korukluoğlu M. (2010) *Listeria monocytogenes*'in Gıdalardaki Önemi ve Halk Sağlığı Üzerine Etkileri. U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 24, Sayı 1

ÖZGEÇMİŞ

1986 Yılında Kayseri'nin Melikgazi ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Kayseri'de, lise öğrenimimi Bursa'da tamamladım. 2008 yılında Kara Harp Okulu'nun Endüstri Mühendisliği bölümünden mezun oldum. 2010 yılında Tunceli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladım. Evliyim ve orta derecede İngilizce bilmekteyim.