

T.C.

İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



İSTANBUL'DA SATIŞA SUNULAN DONDURMALARIN *LISTERIA MONOCYTOGENES* VE *ENTEROBACTERIACEAE* VARLIĞI YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Volkan ABDÜNNUR

GIDA GÜVENLİĞİ VE BESLENME ANA BİLİM DALI

GIDA GÜVENLİĞİ PROGRAMI

MAYIS-2016

T.C.

İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



İSTANBUL'DA SATIŞA SUNULAN DONDURMALARIN *LISTERIA MONOCYTOGENES* VE *ENTEROBACTERIACEAE* VARLIĞI YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Volkan ABDÜNNUR

Y1413.210006

Gıda Güvenliği ve Beslenme Ana Bilim Dalı

Gıda Güvenliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

MAYIS-2016



T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi

Enstitümüz Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı Gıda Güvenliği Tezli Yüksek Lisans Programı **Y1413.210006** numaralı öğrencisi **Volkan ABDÜNNUR**'un "**İSTANBULDA ŞATIŞA SUNULAN DONDURMALARIN LİSTERİA MONOCYTOGENES VE ENTEROBACTERACEAE VARLIĞI YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 27.04.2016 tarih ve 2016/12 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından **g. b. l. j.** ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak **kabul**.... edilmiştir.

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi :12/05/2016

1) Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

2) Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ayla ÜNVER ALÇAY

3) Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Burcu ÇAKMAK

Not: Öğrencinin Tez savunmasında **Başarılı** olması halinde bu form **imzalanacaktır**. Aksi halde geçersizdir.

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**İstanbul’da Satışa Sunulan Dondurmaların *Listeria monocytogenes* ve *Enterobacteriaceae* Varlığı Yönünden İncelenmesi**” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadar ki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve etik geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. 12/05/2016

Volkan ABDÜNNUR

SEVGİLİ MELİN'E...

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca, çalışmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde katkılarıyla beni yönlendiren, yol gösteren ve destekleyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Prof. Dr. Haydar Özpınar'a, tez çalışmamın her aşamasında ve yazım sürecim içerisinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Burcu Çakmak ve Dr. İsmail Hakkı Tekiner, moleküler çalışmada teknik destek veren Selçuk Algingil'e, ayrıca her zaman yanımda olan ve tezimin tüm aşamalarında beni motive eden sevgili Merve Karataşlı'ya, hayatım boyunca beni destekleyen Aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

MAYIS 2016

Volkan ABDÜNNUR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xviii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xix
ÖZET.....	xxi
ABSTRACT	xxiii
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	xxv1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dondurmanın Tanımı ve Bileşimi.....	3
2.2. Dondurmanın Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.4. <i>Enterobacteriaceae</i> Familyası.....	10
2.4.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Türleri.....	10
2.4.1.1. <i>Escherichia (E.) coli</i>	10
2.4.1.2. <i>Klebsiella spp.</i>	11
2.4.1.3. <i>Enterobacter spp.</i>	11
2.5. Dünya’da Yapılan Çalışmalar	11
2.6. Türkiye’de Yapılan Çalışmalar	xxxvi12
2.7. VITEK- MS ile Tiplendirme.....	13
2.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	xxxvii
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	xxxix
3.1. Gereç.....	xxxix
3.1.1. Kullanılan laboratuvar gereçleri ve cihazlar	xxxix
3.1.2. Kullanılan reaktifler.....	16
3.2. Yöntem.....	xli
3.2.1. <i>Enterobacteriaceae spp.</i> mikrobiyolojik incelemesi.....	xli
3.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> mikrobiyolojik incelemesi.....	xliii
3.3. VITEK® MS ile Tiplendirme	xliv
3.4. <i>L. monocytogenes</i> izolatları real-time PCR incelemesi.....	xlv
3.4.1. DNA izolasyonu.....	xlv
3.4.2. Real-time PCR koşulları	xlvi
4. BULGULAR.....	49
4.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Bulguları	49
4.2. <i>Listeria monocytogenes</i> Bulguları.....	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55
KAYNAKÇA.....	63
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER ve KISALTMALAR

BHI	:Brain-heart infusion buyyon
dk	: Dakika
DNA	:Deoksiribonukleik Asit
EHEC	: Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
g, gr	: Gram
Kg	: Kilogram
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemases
L	: Litre
MALDI-TOF MS	: Matriks Yardımcılı Lazer İyonizasyonlu Kütle Spektrometresi
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mg	: Miligram
µm	: Mikrometre
MRD	: Maximum Recovery Diluent
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
real-time PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Hidrojen Konsantrasyonunun Koloritması
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TSB	: Tryptone Soy Buyyon
sn	:Saniye
UHT	: Ultra-High Temperature, Ultra Yüksek Isı
VRBGA	:Violet Red Bile Glucose Agar
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
°C	: Santigrat Derece

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde dondurma ve Sütli buzun mikrobiyolojik değerleri	6
Çizelge 2.2. Listeriozis Bulaşmasına Neden Olan Gıdalar	9
Çizelge 2.3. Dünyada İnsan Listeriozis Salgınları	9
Çizelge 3.1. İncelenen Dondurma Örnekleri Dağılımı	17
Çizelge 3.2. Real-Time PCR Kit Solüsyonu İçerikleri.....	22
Çizelge 3.3. Real-Time PCR Amplifikasyon Koşulları.....	23
Çizelge 4.1. Numunelerin <i>Enterobactericea</i> spp. Sayım sonuçları ve Spesifikasyonları.....	26
Çizelge 4.2. Ambalajlı dondurma örneklerinde tespit edilen <i>Enterobactericeae</i> sayısı.....	27
Çizelge 4.3. Açık dondurma örneklerinde tespit edilen <i>Enterobactericeae</i> sayısı.....	27
Çizelge 4.4: Numunelerin <i>Listeria monocytogenes</i> Sayım sonuçları.....	30

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Sade dondurma üretim şeması.....	4
Şekil 2.2. <i>L. monocytogenes</i> 'in çevre konakçı siklüsü	8
Şekil 3.1. Katılaşması beklenen VRBGA	18
Şekil 3.2. Nutrient Agar' a geçiş	18
Şekil 3.3. Stomacher'a alınmış dondurma örnekleri.....	19
Şekil 3.4. DNA izolasyonu aşaması.....	22
Şekil 4.1. Numune türleri dağılımı.....	25
Şekil 4.2. Ambalajlı dondurmalarda <i>Enterobacteriaceae spp.</i> sayım bulguları	28
Şekil 4.3. Açık dondurmalarda <i>Enterobacteriaceae spp.</i> sayım bulguları	28
Şekil 4.4: Ambalajlı ve açık dondurmaların <i>Enterobacteriaceae Spp.</i> Sayıları Yönünden Karşılaştırılması.....	29

İSTANBUL'DA SATIŞA SUNULAN DONDURMALARIN *LISTERIA MONOCYTOGENES* VE *ENTEROBACTERIACEAE SPP.* VARLIĞI YÖNÜNDE İNCELENMESİ

ÖZET

Günümüzde dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak insanların besin ihtiyaçları da artış göstermiştir. Endüstriyel üretimin gelişmesi ile birlikte hazır gıda tüketimine olan rağbet artmıştır. Fakat tüketimi fazlalaşmış olan hazır gıdalardaki gıda kaynaklı enfeksiyonlar halk sağlığını tehdit etmektedir. Bu gıdalardan birisi de özellikle yaz aylarında ilgi gören dondurmadır. Patojen grubunda olan *Listeria monocytogenes* ve *Enterobacteriaceae spp.* dondurmalarda bulunabilen, insan sağlığını tehdit edebilen bakterilerdir. *Listeria monocytogenes*, doğada yaygın olarak bulunan gıda kaynaklı patojenlerden biridir. Üretim sırasında süte uygulanan pastörizasyon işlemi sayesinde *Listeria monocytogenes* inhibe edilebilmektedir. Gıdalarda bulunması halinde, insanlarda ve bazı hayvanlarda listeriozise neden olmaktadır. Listeriozis ise ilerlemiş olgularda menenjit, septisemi ve spontan abortus ile sonuçlanmıştır. *Enterobacteriaceae spp.*, insan ve hayvan gastrointestinal sistem florasının bileşenlerindedir. İnsanlarda septisemi, üriner sistem enfeksiyonları, kolesistit, yara enfeksiyonları, gastroenterit, menenjit gibi sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bu çalışmada; İstanbul piyasasında satışa sunulan farklı firmalara ait dondurmalarda üretimden satışa kadar olan süreçte kontaminasyon ve çeşitli bulaşmalar ile oluşabilen *Listeria monocytogenes* ve *Enterobacteriaceae spp.* miktarları VITEK-MS ve Real-time PCR cihazları kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Türk Gıda Kodeksi'nde belirlenmiş olan değerler ile karşılaştırılmıştır. Tespit edilen *Listeria monocytogenes* ve *Enterobacteriaceae spp.*'nin ise gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Enterobacteriaceae spp.* tespiti için doğrulama metodu ile bakteri saptanması yapılmıştır. Paralel olarak çalışılan 70 adet numunenin 35 adedinde *Enterobacteriaceae spp.* şüpheli izolat tespit edilmiştir. Bunlardan ise toplamda 20 tanesi Türk Gıda Kodeksi'nin belirlemiş olduğu limite uygun değildir. Bulunan değerler ise; 300-66000 kob/g aralığındadır. Ambalajlı dondurmalarda 3×10^2 - 23×10^2 kob/g *Enterobacteriaceae Spp.* tesbit edilmiştir. Açık satılan dondurmalarda 31×10^1 - 66×10^3 kob/g *Enterobacteriaceae Spp.* tesbit edilmiştir. MALDI-TOF MS prensibiyle çalışan VITEK-MS ile tiplendirilmesi yapılmış olan 20 örneğin, 7 tanesinde hem *Enterobacter cloacae* hem de *Enterobacter asburiae* türlerine rastlanmıştır. 1 tanesinde ise; *Klebsiella pneumoniae* türüne rastlanmıştır. *Listeria monocytogenes* tespiti için ise; tiplendirme sonuçlarına göre paralel çalışılmış olan 70 adet örnekte hiç *L. monocytogenes* tanımlanmamış olup; Real-time PCR kiti prosedürü takip edilerek yapılan analizde izolatların hiç birinin *L. monocytogenes* olmadığı teyit edilmiştir. Ancak, 1 adet *E. faecalis* ve 1 adet *L. innocua* belirlenmiştir. Bu çalışmada; halkın günlük hayatta tüketmekte olduğu bazı dondurmalarda

Enterobacteriaceae spp. ve *Listeria monocytogenes* içeriğinin, Türk Gıda Kodeksi'nin belirlemiş olduğu standartlara uygun olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumun halk sağlığını tehdit edebileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, gıda güvenliği

EXAMINING THE ICE CREAMS OFFERED FOR SALE IN İSTANBUL IN TERMS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND *ENTEROBACTERIACEAE* EXISTENCE

ABSTRACT

Today parallel to the rapid increase of the world's population, the food requirements of people have also increased. Together with the development of industrial production, demand to ready-made food consumption has increased. However the increase in ready-made food consumption threatens public health due to infections in ready-made foods concerning food. One of these foods is especially ice cream that is popular during summer season. *Listeria monocytogenes* and *Enterobacteriaceae Spp.* are bacteria that are included within pathogen group threaten human health. *Listeria monocytogenes* is one of the foodborne pathogens commonly seen in nature. During production by means of pasteurization *Listeria monocytogenes* is inhibited. In case of seen in food, it causes listeriosis in humans and some animals. Listeriosis result in meningitis, septicemia and spontaneous abortus in acute cases. *Enterobacteriaceae Spp.*, is one of the components of human and animal gastrointestinal system flora. Septicemia in human causes health problems such as urinary system infections, cholecystitis, wound infections, gastroenteritis, and meningitis. In this study; ice creams belong to different companies offered for sale in Istanbul from production to sales are evaluated in terms of *Listeria monocytogenes* and *Enterobacteriaceae Spp.* amounts due to contamination and various transmissions by using VITEK-MS and Real-time PCR devices. Obtained results are compared to the values determined by Turkish Food Codex. Determined *Listeria monocytogenes* and *Enterobacteriaceae* is aimed to be evaluated in terms of public health and food safety. For the detection of *Enterobacteriaceae Spp.*, bacteria detection is made via verification method. *Enterobacteriaceae Spp.* suspected isolate is detected within 35 samples among 70 samples working parallel to each other. Totally 20 of them are not conforming to the limit determined by Turkish Food Codex. The values found are between 300-66000 kob/g. Typology of 20 samples are made via VITEK-MS device and both *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter asburiae* types are seen within 7 samples. *Klebsiella pneumoniae* type is seen in one of them. For the determination of *Listeria monocytogenes*; according to VITEK-MS typology results no *L. monocytogenes* is detected within 70 samples studied parallel; no isolates are determined as *L. monocytogenes* as a result of the analysis performed by following Real-time PCR kit procedure. However, 1 *E. faecalis* and 1 *L. innocua* are determined. In this study; it is determined that *Enterobacteriaceae Spp.* and *Listeria monocytogenes* content in some ice creams consumed by the public in their daily lives do not conform to the

standards determined by Turkish Food Codex. It is determined that this condition shall threaten public health.

Key words: *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, food safety

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak insanların besin ihtiyaçları da artış göstermiştir. Endüstriyel üretimin gelişmesi ile birlikte hazır gıda tüketimine olan rağbet artmıştır. Fakat tüketimi fazlalaşmış olan hazır gıdalardaki gıda kaynaklı enfeksiyonlar halk sağlığını tehdit etmektedir. Bu gıdalardan birisi de özellikle yaz aylarında ilgi gören dondurmadır.

Dondurma içerik olarak süt, su, krema, yağsız süt kuru maddesi, şeker, yağ, lezzet ve renk veren katkılar, emülgatör ve stabilizatör içeren, karbonhidrat, protein, yağda ve suda çözünen A, C, D, E ve B grubu vitaminlerce zengin, minerallerden kalsiyum, magnezyum, fosfor, potasyum, sodyum, çinko ve demirce yüksek tüm Dünya’da sevilerek ve yoğun şekilde tüketilen önemli bir gıda ürünüdür (Tekinşen, 2000).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi Uluslararası kuruluşlar dondurma için başlıca kalite parametreleri belirlemiştir. Buna göre; ideal bir dondurma içerikçe % 31–41 kurumadde, 15–17 şeker , % 9–11 yağsız süt, % 8–15 süt yağı ile % 0,2–1 stabilizatör ve emülgatörden oluşmalıdır. Bu genel kompozisyon dondurmanın tipine ve üretim koşullarına göre kendi aralarında farklılıklar gösterebilmektedir (Dığrak ve Özçelik, 1991).

Tarihte dondurma hakkında kim ve ne zaman ilk yapıldığına dair kesin bilgiler bulunmamaktadır. Bazı kayıtlar dondurmanın ilk olarak M.Ö. 1000’lerde Çin’de üretildiğini bildirmekle birlikte, yakın veya benzer ürün olarak Romalıların Alp’lerden getirdikleri karı Neron döneminde (M.S. 37-68) dondurma amaçlı kullandıklarını ifade etmekte. Günümüzdeki dondurmaya en yakın ürünün ilk imal edildiği dönem 16. Yüzyıl Avrupası’dır. Mutfak sanatları açısından ilk dondurma tarifi 1769 yılında İngiltere’de Elizabeth Raffield adlı bir kişi tarafından bir kadın dergisinde yayınlanmıştır (Yöney, 1968; Konar, 1982).

Dondurma, tüm Dünya’da ve Türkiye’de geniş halk yığınları tarafından son derece sevilerek tüketilen bir gıda maddesidir. Endüstriyel gıda sektörü bu geniş tüketici kitlelerine birbirlerinden oldukça farklı olan herkesin damak lezzetine ve tercihlerine

uygun şekilde geniş bir dondurma ürünleri yelpazesini sunmaktadır (Saldamlı ve Temiz, 1988).

Endüstriyel dondurma ve geleneksel açık dondurma üretimlerinden ortak noktalar karışımın hazırlanması, bekletme ve hava yardımıyla dondurma kıvamının verilerek gıda zincirine sunulmasıdır (Armani ve ark., 1965). Günümüzde çağdaş dondurma teknolojileri karışımın hazırlanmasını müteakip eklenen stabilizatörün suyu absorbe ederek, 15-20 dk içinde istenen viskoziteye ulaşması ve 68°C/30 dk, 80°C/25 sn veya UHT yöntemiyle 138°C'de pastörize edilmesi şeklinde uygulanmaktadır (ICMSF, 1980).

Dondurma, üretim ve saklama süresinde farklı sebeplerle mikrobiyel bulaşmalara son derece elverişlidir. Dondurma imalatı için gerekli sıhhi şartlar sağlanmadan üretilen ürünler saklama süresince insan sağlığı açısından riskli mikroorganizmaların gelişmelerine yol açmaktadır. İngiltere'de 1950-1955 yılları arasında dondurma kaynaklı on bir gıda zehirlenmesi rapor edilmiştir. Benzer şekilde Amerika Birleşik Devletleri'nde 1986 yılında bir dondurma markasında *Listeria spp.* tespit edilmiş, dört eyalette görülen bu salgında kırk kişi infekte olarak hastaneye kaldırılmıştır. Aynı *Listeria* salgını Fransa'da satılan bir dondurma markasında da belirlenmiş ve ürünler satıştan toplatılarak imha edilmiştir (Rothwell, 1990).

Türkiye'de dondurma imalatı çoğunlukla orta ve küçük işletmeler ile geleneksel pastanelerde yapılmaktadır. Bu durum yetersiz hijyen koşulları ve zayıf teknolojik altyapının insan sağlığı ve gıda güvenliği bakımından dondurma ürünlerinin risk teşkil etmelerinde en büyük faktörlerdir.

Bu çalışmada; İstanbul piyasasında satışa sunulan farklı firmalara ait dondurmalarda *Listeria monocytogenes* ve *Enterobacteriaceae spp.* türleri mikrobiyolojik olarak incelenmiş, elde edilen izolatların VITEK®MS otoanalizör ile karakterizasyonu yapılmış, moleküler real-time PCR tekniğiyle doğrulaması, sonuçların Türk Gıda Kodeksi'nde belirlenmiş olan değerler ile karşılaştırması ve analiz edilen gıda maddelerinin halk sağlığı ve gıda güvenliği bakımından değerlendirilmeleri amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dondurmanın Tanımı ve Bileşimi

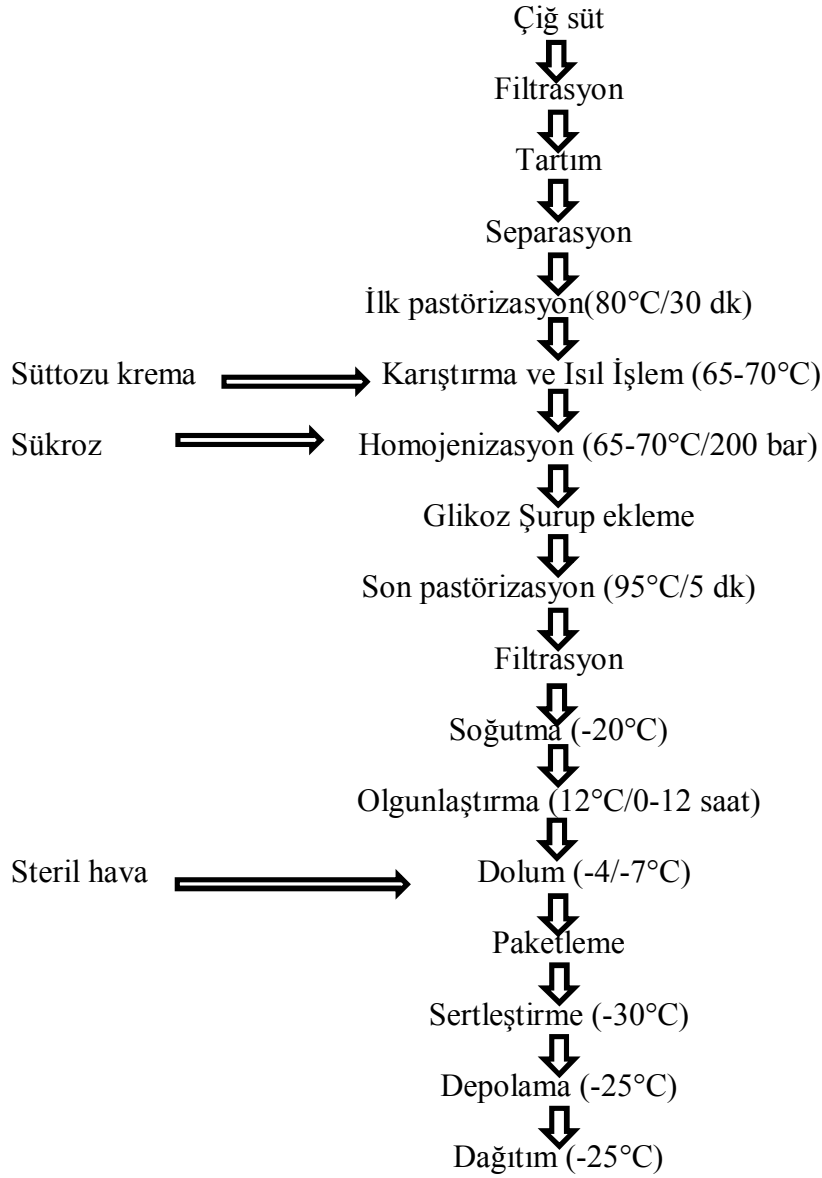
Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği dondurmayı tat ve çeşitlerine göre, yapımında süt ve süt ürünleri, kaliteli içme suyu, şeker ve katkı maddeleri içeren, müşteri tercihlerine göre istenildiğinde sahlep, yumurta ve yumurta ürünleri ve aroma veren katkı maddeleri ile başka çeşnilerin kullanıldığı, pastörize edilmiş ve belli bir kıvamda tüketicilere sunulan gıda maddesi olarak tanımlamaktadır (Anonim, 2004).

Dondurma çeşitlerinden karışık dondurmada kaymak, çeşitli meyveler ve konsantreleri, meyve suları, kakao, vanilya, fındık içi, Antep fıstığı ve başkaca çeşniler reçetesine eklenmektedir (Coşkun, 2005).

Dondurmanın tipik özelliklerinin oluşmasından en önemli girdi süttür. Süt dışında bileşime giren proteinler, karbonhidratlar, tuzlar ve stabilizatörler, katılaşmış yağ globülleri (~2,3 µm), buz kristalleri (<30-50µm) ve bu yapılar arasında arasında dondurmanın hacminin bir kısmını oluşturan 60-170 µm çapında hava hücrelerinden oluşan köpük kısım bulunmaktadır. Dondurmanın %57-70'i katı ve sıvı fazlardan bulunan sudan oluşmaktadır. Başlıca su kaynağı ana girdi süt ve diğer bileşenlerden gelmektedir. Kalan %15-60 arası kompozisyon ise hava, yağ ve serum emülsiyonu olarak dağılmıştır (Tekinşen, 2008).

Endüstriyel dondurma kremalı süt, yağsız süt, su, krema, tereyağı, sıvı tereyağı, konsantre ya da yağsız süt tozu, sakkaroz veya invert şeker ve gıda additiflerinden farklı kombinasyonlarda bileşenlerden oluşmaktadır (Kon, 1972). Bu bileşenler reçeteye göre belli oranlarda karıştırılırlar ve devamında pastörizasyon amacıyla ısıtılıp işleme maruz bırakılırlar. Pastörizasyon sürecini takiben dondurma karışımı yağ taneciklerinin küçülmesi ve bu şekilde soğutma esnasından topaklanmasının önlenmesi için homojenize edilir. Homojenizasyonu bitirilmiş karışım özel tip bir soğutucuda +4°C'de olgunlaşması için dondurma işlemine alınır. Dondurma işlemi bitiminde direkt olarak satışa sunulabileceği gibi, paket ambalajlarda tekrar derin dondurucularda sertleştirilerek tüketiciye ulaştırılır (Robinson, 1985).

Farklı üretim tekniklerine sahip olan dondurma için; sade dondurma üretim şeması ise aşağıdaki şekilde belirtilmiştir;



Şekil 2.1. Sade dondurma üretim şeması (Tekinşen, 1987).

2.2. Dondurmanın Mikrobiyolojik Özellikleri

Dondurma üretiminde reçetesini oluşturan başta hayvansal kaynaklı gıda maddesi süt olmak üzere diğer pek çok girdi mikroorganizmalar ile bulaşma riski taşımaktadır. Üretim esnasından en az bir defa pastörizasyon yapılmasına rağmen, diğer üretim aşamalarında bulaşma olasılığı devam etmektedir. Dondurma pek çok mikroorganizma için ideal bir yaşam ortam sağlamaktadır. Besin öğeleri bakımından

çok zengin olan dondurma ısıt işlem görmüş olsa dahi, sporlar etkisizleştirilememektedir. Dondurmada ısıt işleme en dayanıklı mikroorganizmalar genellikle patojen ve toksik mikroorganizmalardır. Dondurmada sıklıkla tespit edilen bulaşma kaynakları aşağıda sunulmaktadır:

- Süt, süttten üretilen ve diğler katkı maddeleri,
- Makineler, aletler ve muhtelif ekipmanlar,
- Su,
- Çevresel faktörler,
- Üretim personeli,
- Ambalaj malzemeleri,
- Lojistik ve dağıtım zinciri

Dondurma üretim ve satış zinciri aşamasına kadar mikrobiyolojik riskleri en aza indirecek en önemli faktör soğuk saklama ve düşük sıcaklıktır. Bu noktada olacak herhangi bir kopukluk ya da hata dondurmaya mikrobiyolojik bakımdan riskli bir duruma getirmektedir (İnal, 1990).

Dondurma kalitesi üzerinde son derece etkili mikroorganizmalar arasında *Bacillus Spp.* sporları, mikrokoklar, enterokoklar, korinebakterler önemli roller oynamaktadırlar. Bu tür bakterilerin başlıca kaynakları dondurma girdilerinden olan süt ve süt tozu olup, geliştiğı ve çoğaldıkları dondurmalarda acımsı bir tat oluştururlar (Or, 2009). Bu nedenle, pastörizasyon gibi ısıt işlem uygulamalarının tek başlarına yeterli olmadıkları görülmektedir. Sonuç olarak dondurma imalatındaki tüm hammadde girdilerinin kontrolü ve üretimde iyi üretim ve hijyen tekniklerinin uygulanması gıda güvenliğı ve tüketici sağlığı açılarından büyük önemler taşımaktadır (İnal,1990).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğine göre dondurmalarda geçerli mikrobiyolojik değerler Çizelge 2.1'de verilmiştir. Buna göre dondurmalarda en riskli mikroorganizmalar *Listeria monocytogenes* ve *Enterobacteriaceae Spp.* türleridir.

Çizelge 2.1: Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde Dondurma Ve Sütü Buzun Mikrobiyolojik Değerleri (Anonim, 2011).

Mikroorganizma	Limitler (kob/g)
<i>Enterobacteriaceae</i>	10 ¹ -10 ²
<i>L.monocytogenes</i>	0-25

2.3. *Listeria monocytogenes*

1926 yılında Cambridge Üniversitesi'nde yapılan araştırmalarda, tavşanlarda meydana gelen bir salgında saptanmış ve *Bacterium monocytogenes* adı verilen Gram pozitif olan bu bakterinin epidemik bir enfeksiyona neden olduğunu bildirilmiştir. Bir yıl sonra Güney Afrika' da yürütülen çalışmalarda yeni bir bakteri izole edilmiş ve keşfedeni Lord Lister anısına *Listerella hepatolytica* adı verilmiştir. İlerleyen yıllarda devam eden araştırmalara dayanılarak adı *Listeria monocytogenes*, 1940 yılında yapılan sınıflandırmada ise *Listeria monocytogenes* olarak son şeklini almıştır (Ryser ve Marth, 1991).

Listeria cinsinin tanımlanmasından sonra ise uzun bir süre *Listeria monocytogenes* bu genusun tek türü olarak bilinmiştir. *L.grayi* 1966 yılında, *L.murayi* 1971 yılında, *L.innocua* 1981 yılında, *L.seeligeri* ve *L.welshimeri* 1983 yılında ve 1985 te *L.ivanovii* türleri tanımlanmıştır. Yapılan filogenetik analizler ve moleküler biyoloji metotlarının etkisi sayesinde günümüzde *Listeria* genusu *L. monocytogenes*, *L.welshimeri*, *L.seeligeri*, *L.ivanovii*, *L.innocua* ve *L.grayi* olmak üzere altı adet alt gruptan oluşmaktadır (Ryser ve Marth, 1991).

Listeria monocytogenes; çubuk şekillinde, Gram pozitif, düzgün, spor oluşturmeyen 6 türden oluşmaktadır. Bunlardan iki tanesi patojen (*L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*) ve dört tanesi patojen olmayan (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, ve *L. grayi*) türlerdir (Seeliger ve Bockemühl, 1968).

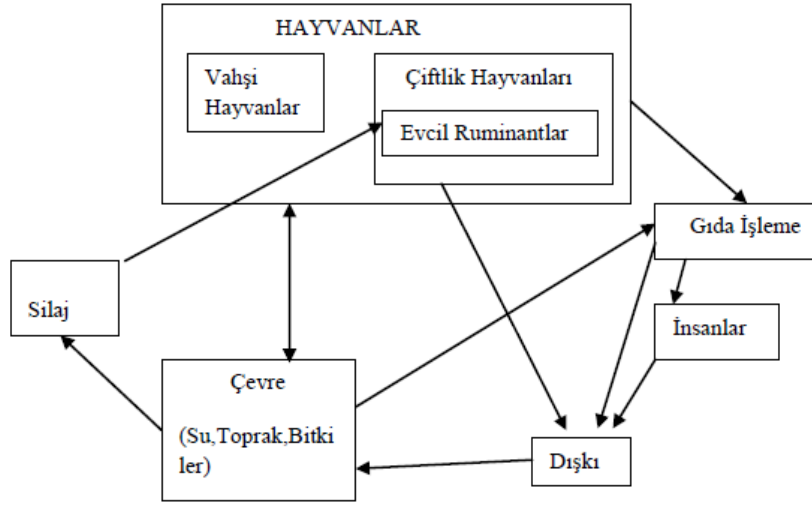
L.monocytogenes intrasellüler yani hücre içi bir bakteridir. Bu sayede lökosit ve fagositik makrofajlar içinde canlı kalabilme ve çoğalabilme özelliğine sahiptir (Gönülalan, 2010).

Listeria türü bakteriler küçük (0,5 µm çap,1- 2 µm uzunluk), düzgün, yuvarlak kenarlıdır. Tek halde bulunabildikleri gibi kısa zincir halinde de bulunabilirler. Gram pozitif bakteriler olup, aerob özellik göstererek spor oluşturmazlar. Optimal üreme sıcaklıkları 30-37°C' dir, 20-25°C' de üredikleri zaman peritrik flagellalar oluşturarak hareket edebilirler, ancak 37°C' de üredikleri zaman da çok az hareketli veya hareketsizdirler. Triptoz agarlı besiyerlerinde üretilen kolonileri görüntüsü ise tipik mavi-yeşil renk ve parlama gösterirler (Galsworthy ve ark., 1990).

Listeria spp. optimal üreme için genellikle biotin, riboflavin, tiyamin, alfa lipoik asit ve amino asitlere ihtiyaç duymaktadır. Karbonhidratlardan (örnek olarak glikozdan) yan ürün olarak asitler üretilir ve bunlar *Listeria* spp.'nin çoğalması için gereklidir. Genel olarak *Listeria* spp. selektif olmayan bazı besi yerlerinde iyi üremektedirler. Tryptone soy buyyon (TSB) ya da Brain-heart infusion (BHI) buyyon gibi seçici olmayan besi yerlerinde aerobik ve anaerobik olarak üreyebilmektedirler. BHI buyyonda 30°C/ 12 saat inkübasyon sonunda bakteri durağan faza geçmektedir (Gönülalan, 2010).

Listeria türlerinin gıda, çevre ve fekal kaynaklardan izolasyonu için pek çok farklı besi yerleri kullanılmaktadır. ISO, 11290-1 ve 2 standartları PALCAM ve OXFORD selektif agarları önermiştir. Çünkü bu tip ağarlarda ortası bombeli tipik morfolojilerin gelişmesi olası görünmektedir. Son yıllarda *L. monocytogenes* tespitinden kromojen ağarlar yaygın şekilde kullanılmaya başlamıştır (Gönülalan, 2010).

L. monocytogenes'in en önemli özelliği gıda ile taşınarak, gıdanın raf ömrünün sonuna kadar gıdayı ağır olarak kontamine etmesine olanak vermesidir. *L. monocytogenes*' in gelişmesi için ideal ortam sunan başlıca gıda maddeleri arasında peynirler, sütler, ısıl işlem görmüş sosis gibi et ürünleri, farklı etler, füme balık, deniz kabukluları ve işlenmiş sebzeler gelmektedir. Bu tür gıda maddelerinin *L. monocytogenes* için uygun pH alanları yarattıkları ve değişen fizikokimyasal özelliklere sahip oldukları bilinmektedir (Gönülalan, 2010).



Şekil 2.2. *L. Monocytogenes*'in Çevre Konakçı Siklüsü (Ivanek ve ark., 2006)

Dünyada yapılan çalışmalara göre, insanlarda görülen listeriozis vakalarının genel olarak direkt bulaşma olarak veya sekonder olarak patojenik *Listeria* türleri ile kontamine olmuş olan gıdaların tüketilmesi sonucu meydana geldiği belirtilmektedir (Barza, 1985).

Listeriozis, insanlar ve bazı hayvanlarda görülmekte ve genel olarak uterusu ve gebelik dönemini, merkezi sinir sistemini veya dolaşım sistemini etkilemektedir. Hayatı tehdit eden enfeksiyon fark edilir türdendir (Gönülalan, 2010). Enfeksiyon genel olarak antibiyotik yardımı ile tedavi edilir fakat bazı durumlarda ise insandaki listeriozis vakası sonucu ölüm oranı %20-40 aralığında gerçekleşmektedir (Farber ve Peterkin, 1991).

Listeriozis vakaları yaz sonunda ve sonbahar aylarında yükseliş göstermekte iken, hayvanlarda ise ilkbaharda daha fazla görülmektedir. Ortalama olarak enfeksiyon 30 gün civarında seyretmektedir (McLauchlin ve ark., 1991).

Listeriozis hastalığının insanlara bulaşmasına neden olan gıdalar ise aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 2.2: Listeriozis Bulaşmasına Neden Olan Gıdalar (Ryser ve Marth, 1991)

Süt ürünleri	Et	Balık	Sebze meyve	Kompleks Gıdalar
Yumuşak peynir	Piştirilmiş tavuk	Balıklar	Lahana salatası	Sandviç
Çiğ süt	Hindi frankfurter	Kabuklu deniz ürünleri	Tuzlanmış mantar	
Dondurma	Sucuk-sosis	Karides	Doğranmış meyveler	
Tereyağı	Kelle domuz kıyması ve	Tütsülenmiş balık	Çiğ sebzeler-turşu	

Dünya çapında yapılan araştırmalara göre insanlardaki listeriozis vakalarının büyük kısmı *L.monocytogenes*'in süt, süt ürünleri, et, kanatlı eti, sebze, salatalar ve deniz ürünleri gibi patojen *Listeria* türleriyle kontamine gıdaların tüketilmesiyle bulaştığını belirtmiştir. Bu vakalarının coğrafik dağılım göstermesi de enfeksiyonun en yaygın kaynağının gıda kaynaklı bulaşma olabileceğini göstermektedir (McLauchlin ve ark., 1991). Dünyadaki insan Listeriozis salgınları dağılımı ise aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 2.3: Dünyada İnsan Listeriozis Salgınları (McLauchlin, 1996)

Yer	Vaka sayısı	Muhtemel kaynağı
Almanya-1966	279	Bilinmiyor
Fransa-1976	162	Bilinmiyor
ABD-1979	20	Çiğ sebze ve süt
Yeni Zelanda-1980	21	Deniz ürünleri
Kanada-1981	41	Lahana salatası
ABD-1983	49	Süt
İsviçre-1983-1984	25	Bilinmiyor
ABD-1985	86	Yumuşak peynir

2.4. *Enterobacteriaceae* Familyası

Enterobacteriaceae türleri insan ve hayvan barsak mikroflorasının en yaygın üyeleridirler. Günümüzde tıp alanında en çok mücadele verilen infeksiyon kaynaklarının başından gelmektedirler. İnsanlarda yol açtıkları başlıca infeksiyonlar arasında üriner sistem, yara, sindirim sistemi, menenjit ve pnömoni infeksiyonları gelmektedir. *Enterobacteriaceae* türleri Gram (-), fakültatif anaerob, ve şekeri fermente edebilen, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve nitratı nitrite indirgerler (Tham, 2012).

2.4.1. *Enterobacteriaceae* Türleri

2.4.1.1. *Escherichia (E.) coli*

E. coli bakterisi ilk kez 1885 yılında çocuk ishal vakasında izole edilmiştir. Chalmer ve Castellani adlı bilimadamları 1919 yılında bu bakteriye *Bacterium coli* adını vermişlerdir. İleri yıllarda bakterinin yeni adı karakteristik özelliklerini tanımlayan bilimadamının adını ve doğal üyesi olduğu barsak tanımını alarak, *Escherichia coli* şeklinde belirlenmiştir (Unat, 1986; Töreci ve ark., 2002).

E. coli Gram (-), fakültatif anaerob ve sporsuz bir mikroorganizmadır. *E. Coli* gıda sektörü için fekal kaynaklı bulaşmaya işaret eden gösterge bir mikroorganizma olarak gıda kodekslerinde yer almıştır. Çok sayıda türü bulunmaktadır. Ancak, bu türler arasında patojen (hastalık yapıcı) olanlar başlıca dört ana grupta toplanmaktadır (Tham, 2012).

Bunlar:

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC): Enterotoksin oluşturan ve iki yaş altı çocuklarda diyareye yol açan türdür (Bilgehan, 2000).

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC): Süt çağı çocuklarında ağır diyare ve salgına yol açan türdür (Erdem, 1999).

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC): O157:H7 olarak bilinen, son derece tehlikeli, başlıca gıda ve su yolları ile yayılan ve infekte ettiği hastada ileri zamanlarda anemi ve nefropatiye yol açan türdür (Erdem, 1999).

Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC): Mukozada ülser ve salgılı lezyona yol açan türdür (Bilgehan, 2000).

2.4.1.2. *Klebsiella spp.*

Klebsiella Edwin Klebs tarafından keşfedilmiş, spor oluşturmeyen, kısa uçları yuvarlak, Gram (-), hareketsiz, fakültatif anaerob ve ideal gelişme sıcaklığı 37°C olan bakteri genusudur (Erdem, 1999). Bu genusun başlıca alt grupları arasında *K. pneumoniae*, *K. granulomatis* ve *K. oxytoca* gelmektedir. İnsanlarda görülen infeksiyonların başlıca sebepleri arasında olup, insan dışkısında 10^4 kob/g bulunmaktadır (Tham, 2012). Son yıllarda bu türün içinde plazmid aracılı *Klebsiella pneumoniae* carpapenamaz (KPC) olarak bilinen genişlemiş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişimi tüm Dünya’da artan şekilde görülmektedir (Nicasio ve ark., 2008; Nordmann ve ark., 2009).

2.4.1.3. *Enterobacter spp.*

Enterobacter türleri Gram (-) ve antimikrobiyal ajanlara enterobakterilere göre çok daha fazla dirençli mikroorganizmalardır (Wade ve ark., 1991). Gıdalarda en sıklıkla izole edilen tipleri arasında *E. aerogenes*, *E. cloacae* ve *E. Asburiae* gelmektedir (Ahmet ve ark., 1995).

2.5. Dünya’da Yapılan Çalışmalar

Nawal. Gh. ve ark.(1997) Amerika Birleşik devletleri’nde satılan dondurmalarda yatıklarımıkrobiyolojik incelemelerde *Listeria* türlerinin bulunma sıklığını %8 olarak tespit etmişlerdir.

Cordano ve Rocourt (2001) Şili’de satışa sunulan dondurmalarda %3,5-7,4 oranlarında *Listeria monocytogenes* bulmuşlardır.

Dhanashree ve Otta (2003) Hindistan’da tüketilen dondurmalarda *Listeria* türlerinin görülme oranlarını %17,5 olarak belirlemiştir. *Listeria* türleri arasında en baskın fenotipler *L. innocua* ve *L.monocytogenes* olduğu görülmüştür.

Molla ve arkadaşları (2004) inceledikleri dondurma örneklerinin *L. monocytogenes* tipini en yaygın suş olarak tespit etmişlerdir.

Robinson (2005) İngiltere, Galler, İskoçya ve Kuzey İrlanda’da satılan dondurmalarda *L. monocytogenes* bulunma oranını %26, Hindistan Bombay şehrinde açık satılan tüm dondurmalarda %100, Avustralya’da %13,9, Kosta Rika’da %2 ve son olarak 1999 yılı verilerine göre Türkiye’de %10 olarak bildirmiştir.

Brezilya’da yürütülen bir diğer çalışmada ise incelenen toplam 60 adet dondurma örneklerinin hiç birisinden *Listeria* izolatları elde edilmemiştir (Abrahão ve ark., 2008).

ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından 1998-2008 yılları arasında bildirilen *Listeria* kaynaklı toplam 359 hastalık, 258 hastanede tedavi vakası ve 38 ölümün sebepleri arasında çeşitli dondurmaların tüketimlerinin de olduğu rapor edilmiştir (CDC, 2011a; CDC 2011b; DCD, 2013; Cartwright ve ark., 2013).

Bu çalışmaya benzer bir araştırma ise Saludes ve ark. (2015) tarafından 2008 ve 2012 yılları arasında Şili’de yapılmıştır. Çalışmada Şili’nin muhtelif bölge ve şehirlerinden toplanan 2.647 adet muhtelif gıda örnekleri arasında *Listeria monocytogenes* pozitif sonuç veren toplam 265 adet gıdaların %1’i dondurma örneklerinden oluşmuştur.

2.6.Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Keskin ve arkadaşları (2007), İstanbul ili sınırları içinde tüketicilere sunulan dondurmaların %12,7’sinin Gıda Kodeksi Mikrobiyoloji Kriterler Tebliğine uymadıklarını belirlemiştir.

Ağaoğlu ve Alemdar (2004) Van ilinde satılan dondurmaların % 13,3’ünün *E. coli* ile bulaş olduklarını tespit etmişlerdir. Bu oranın sade dondurmalarda %8, meyveli dondurmalarda ise % 5,3 gerçekleştiği belirlenmiştir.

Jaleli ve Abedi (2008) ise inceledikleri dondurmaların yalnızca %1,3’ünün *L. monocytogenes* içerdiğini göstermiştir.

Benzer şekilde Gönülalan (2010) Kayseri’de yürüttüğü bir çalışmada incelediği dondurma örneklerinin %24’nün *Listeria* türleri bakımından pozitif oldukları tespit etmiştir.

Türkiye’de *Listeria monocytogenes*’in dondurmalarda varlıkları, gelişimi ve çoğalmasını önlemeye dönük yapılan çalışmalarda Çiftçioğlu ve ark. (1992) inceledikleri toplam 50 adet dondurma örneklerinin 45 adet *Listeria monocytogenes* ile yüksek miktarlarda bulaş olduklarını, Akman ve ark. (2006) Adana ve Kahramanmaraş illerinde satılan farklı dondurmaların %13,8 ile %17,2 arasında değişen oranlarda *Listeria monocytogenes* tespit edildiğini, Gunduz ve

Tuncel (2006) dondurma üreten firmalardaki makineler ve aletlerde *Listeria monocytogenes*' in biyofilm oluşturma kabiliyetini ve bu durumu engellemeye dönük tedbirleri araştırırken, Ozturk ve ark. (2010) bitkisel kaynaklı ekstraktlardan *Listeria monocytogenes*' in inhibisyonuna nasıl faydalanılacağını irdelenmiştir.

2.7. VITEK- MS ile Tiplendirme

Kütle spektrometresi otomatik mikrobiyal Tiplendirme yapan bir sistemdir. Çalışma prensibi (Matriks Yardımcılı Lazer İyonizasyonlu Kütle Spektrometresi) mikroorganizmanın protein profilini inceleyerek referans bir spekturum ile karşılaştırma esasına dayanmaktadır (Rıfaat ve ark., 2014).

Bu teknik ile şekerler, peptitler, proteinler gibi biyomoleküller lazer ışını yardımı ile parçalanarak kütleleri ile orantılı olarak absorpsiyonu sayesinde tanımlanmaktadır Kütle spektrometresi mikrobiyoloji laboratuvarlarında farklı kökenlerden izole edilen suşların hızlı, doğru ve yüksek güvenilirlikle tanımlamasını yapan bir cihazdır (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

2.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR yöntemi moleküler teknolojideki en önemli gelişmelerden biri olup yöntem, belli bir uzunluktaki DNA diziliminin *in vitro* replikasyonuna ve DNA polimeraz enziminin hedef DNA'yı *in vitro* çoğaltması ilkesine dayanır. PCR reaksiyonu araştırılması istenen örnekteki DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı yardımı ile birbirinden ayrılmasına yani denatürasyona, daha sonra da sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını, sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Tüm bu basamaklara amplifikasyon işlemi denmektedir. (McPherson ve Moller, 2000).

PCR yöntemindeki temel bileşenler; hedef DNA, hedef DNA'nın dizilerini tamamlayan tek zincirli primerler, 4-deoksiribonükleotid trifosfat ve ısıya dayanıklı olan DNA polimerazıdır. En çok kullanılan DNA polimeraz *Thermus aquaticus* adı verilen termofilik bakteriden izole edilir ki buna Taq DNA polimeraz adı verilmektedir. Bakteri tanımlanması için ise; genellikle basit bir PCR turu kullanılır ve bazı durumlarda nested PCR, multipleks PCR, real-time PCR gibi farklı yöntemleri de kullanılabilir (Siqueria ve Roças, 2003).

PCR'un başlıca kullanım alanları; mikrobiyolojik çalışmalar, adli tıp ve genetik bozuklukların belirlenmesi olarak özetlenebilir. Cihazın avantajları; tekniğin çok hızlı olması, kan serum, doku, hücre gibi materyallerin yanı sıra eski zamanlara ait kurutulmuş örneklerinde incelenebilmesi; toksinlerin ve virüslerin teşhis edilebilmesi antimikrobiyal ilaçlara dirençli olan bakterilerin saptanabilmesidir (Walker ve Douan, 1989).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu araştırmada İstanbul ili sınırları içinde satılan açık ve ambalajlı dondurma örnekleri *Listeria monocytogenes* ve enterobakterilerin varlıkları bakımından mikrobiyolojik yöntemle incelenmiştir. Bu amaçla, toplam 70 adet dondurma analiz edilmiştir. Ambalajlı dondurmalar 15 farklı işletmeden 4 farklı markaya ait çikolatalı, sade ve karışık olarak tercih edilmiştir. Açık satılan dondurmalar ise 15 farklı işletmeden alınmış olup, 100'er gram miktarda çikolatalı, sade ve karışık olarak tercih edilmiştir. Örnekler steril numune torbalarına konulmuş ve +4⁰C'deki özel taşıma kutusunda gıda mikrobiyolojisi laboratuvarına taşınmış ve bekletilmeden incelemeye alınmıştır.

3.1.1. Kullanılan laboratuvar gereçleri ve cihazlar

- Hassas elektronik terazi
- Otoklav
- İnkübatör
- SLAN®-96S real-time PCR
- VITEK®MS kütle spektrometresi (bioMérieux)
- Eküvyon çubuğu
- Petri
- Öze
- Bunsen beki
- Cam beher
- Spatül
- Pens
- Etil alkol

- Cam deney tüpü
- Schott ŐiŐeler
- Filtreli torba
- Otoklav torbası
- Cam mez r
- 10 ml tek kullanımlık plastik pipet
- Parafilm
- MS pleyti
- Matriks CHICA solüsyonu
- Steril eldiven
- Mikropipet 1-10  l, 10-100  l
- Pipet uçları 1  l, 100  l ve 200  l

3.1.2.Kullanılan reaktifler

- Saf su
- Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
- Violet Red Bile Glucose agar (VRBGA) (LAB088)
- Nutrient agar (Merck 1.05450)
- Glukoz agar (M107315.0500)
- Oksidaz test kiti (M113300.0001)
- Half-Fraser buyyon (Merck 1.10399)
- Fraser buyyon (Merck 1.10399)
- PALCAM besiyeri (Merck 1.11755)
- Kanlı agar (Merck 1.10886)

Çizelge 3.1: İncelenen dondurma örnekleri dağılımı

Numune Türü	Adet (n)
Ambalajlı sade dondurma	11
Ambalajlı çikolatalı dondurma	11
Ambalajlı karışık dondurma	11
Açık sade dondurma	12
Açık çikolatalı dondurma	12
Açık karışık dondurma	13

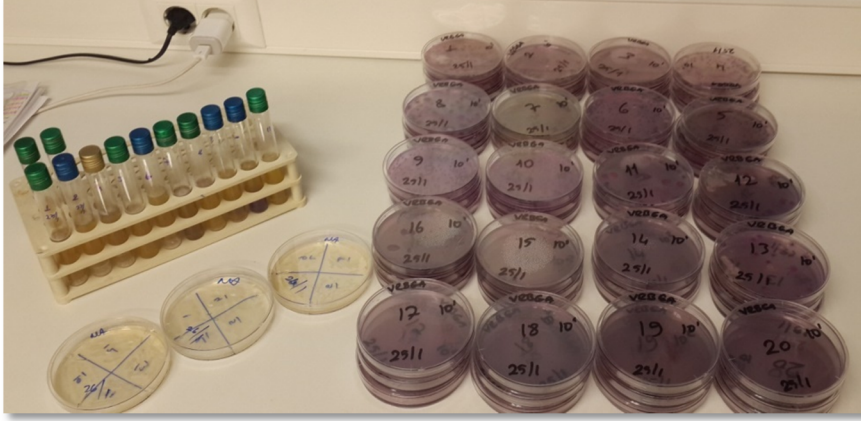
3.2. Yöntem

Enterobacteriaceae Spp. sayımı ve izolasyonu ISO 21528-2 metoduna göre, *Listeria monocytogenes* sayımı ve izolasyonu ise ISO 11290-1 metoduna göre yapılmıştır. Klasik yöntem ile tespit edilen *Enterobacteriaceae Spp.* şüpheli koloniler MALDI TOF MS teknik bazlı olan VITEK MS, (BioMerièux, Fransa) cihazı kullanılarak tiplendirilmiştir. *Listeria monocytogenes* şüpheli koloniler yine VITEK MS ve aynı zamanda ve Real-Time PCR cihazı (SLAN -96S) ile tiplendirilmeye çalışılmıştır.

3.2.1. *Enterobacteriaceae spp.* mikrobiyolojik incelemesi

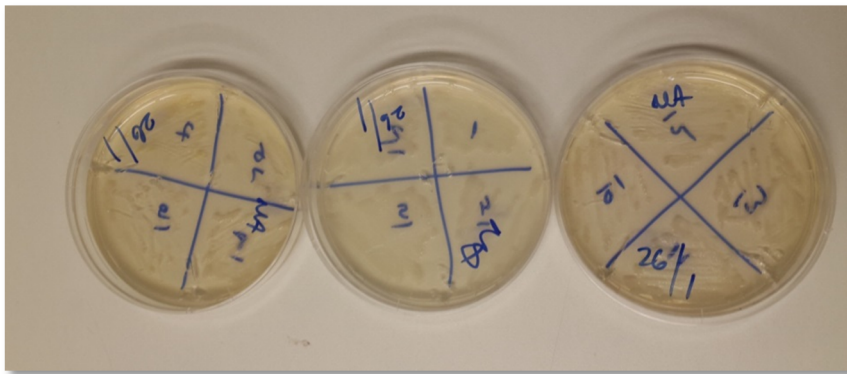
Enterobacteriaceae spp. için kullanılan yöntemde ilk olarak besiyeri hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Maximum Recovery Diluent (MRD), Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA), Nutrient Agar ve Glukoz Agar besiyerleri hazırlanmıştır. Numunelerin analize hazırlanmaları ise şu şekildedir; 10 g numune hassas terazide tartılarak steril poşete konuldu. 90 ml Maximum Recovery Diluent (MRD) ile stomacherde 1/10 oranında homojenize edilmiştir.

Her numune için, numuneden beklenen mikroorganizma sayısına göre dilüsyonlar hazırlandı. Numune stomacherde homojenize edildikten sonra 1/10 seyreltilmiş olur (10^{-1}). Yeni bir pipetle bu dilüsyondan 1 ml alınarak içinde 9 ml dilüsyon sıvısı (MRD) bulunan başka bir tüpe aktarıldı. Böylece 10^{-2} lik dilüsyon hazırlanmış olur. Daha ileri dilüsyonlar için 10^{-2} den 10^{-3} ve 10^{-4} gibi ileri ondalık dilüsyonlar elde edildi. Son dilüsyondan ilk dilüsyona doğru gitmek koşulu ile her seyreltimden disposable 2 ayrı petri kutusuna 1'er ml konuldu. Üzerlerine 10 ml 45°C'ye soğutulmuş VRBGA dökülerek ve petri yatay şekilde hareket ettirilerek inokulum ile karışımı sağlanmıştır.



Şekil 3.1: Katılaşması beklenen VRBGA

Karışımın katılaşması beklendikten sonra, bakteri yayılmasını engellemek ve fakültatif anaerop ortam sağlamak için katılaşmış yüzeyi tamamen kaplanacak şekilde 15 ml 45°C'ye soğutulmuş VRBGA eklendi. Bu şekilde fakültatif anaerob ortam oluşması sağlanmış oldu. Katılaştıktan sonra ters çevrilen petriler 37°C 24 saat süre ile inkübe edildi. Daha sonra koloniler değerlendirildi. VRBGA agarda zon oluşturan veya oluşturmayan pembe, kırmızı, mor renkteki koloniler karakteristik kolonilerdir. Karakteristik tipik kolonilere doğrulama işlemi yapıldı. Doğrulama işlemi için; tipik kolonilerden Nutrient Agar'a geçiş yapıldı ve 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra Nutrient Agar'da saflaştırılan kolonilere oksidaz testi yapıldı. Nutrient Agarda iyi izole edilen kolonilerden öze yardımı ile alınarak strip üzerine sürüldü. 60 sn içerisinde strip üzerinde koyu mor renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Renk değişim yok ise negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.2: Nutient Agar' a geçiş

Oksidaz negatif veren koloniler fermentasyon testine tabii tutuldu. Oksidaz (+) veren kolonilerden Glukoz Agara ekim yapıldı ve 37°C de inkübe edildi. Tüpün

tamamı eğer sarı renkte ise pozitif olarak değerlendirildi. Bütün bu işlemlerin sonucunda oksidaz negatif, glukoz pozitif olan koloniler *Enterobacteriaceae spp.* olarak değerlendirildi. Pozitif olarak değerlendirilen izolatlar ayrıca MALDI TOF MS bazlı VITEK®MS cihazı kullanılarak identifiye edilmiştir.

3.2.2. *Listeria monocytogenes* mikrobiyolojik incelemesi

L.monocytogenes mikrobiyolojik incelemesi ISO 11290-1 metodu takip edilerek yapılmıştır. Buna göre 25 gram dondurma örneği steril stomacher torbasına konulmuş ve üzerine 225 ml Half-Fraser Buyyon eklenmiştir. Süspansiyon Stomacherde 2-4 dakika homojenize edilmiş ve devamında 30°C/24-26 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.3: Stomacher'a alınmış dondurma örnekleri

Ön zenginleştirme kültüründen selektif zenginleştirme amacıyla inkübasyon bitiminde inkübe edilmiş solüsyondan pipetle 0,1 ml alınarak 10 ml Fraser buyyon içeren cam tüplere aktarılmış ve 37°C/48 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda selektif katı besiyeri PALCAM öze yardımıyla ekim yapılarak bir kez daha 37°C/24 saat inkübasyona konulmuştur. İnkübasyon sonunda PALCAM agarda gelişen 1-2 mm çapında zeytineşili-gri renkli ve siyah zonlu koloniler şüpheli kabul edilerek doğrulama yapılmıştır. Bu amaçla izole edilen *L. monocytogenes* şüpheli kolonilere gram boyama, katalaz Beta-hemoliz testi yapılmıştır. Testlerin bitiminde katalaz pozitif, Gram pozitif ve Beta-hemoliz pozitif

koloniler MALDI-TOF MS (VITEK®MS) cihazında ve Real-time PCR cihazında karşılaştırmalı olarak doğrulanmaya çalışılmıştır.

3.3. VITEK® MS ile Tiplendirme

MALDI TOF (MALDI TOF MS; Matriks Aracılı Lazer İyonizasyonlu Kütle Spektrometresi- ‘Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry’) kütle spektrometresi temelinde mikroorganizmaları tanımlayan sistemdir ve bakteri hücrelerinin protein profilini çıkararak veri tabanında bulunan referans bir spektrum ile karşılaştırma yapmasına dayalı identifikasyon yöntemidir [22]. VITEK-MS cihazı bu prensiplere bağlı kalarak sadece mikrobiyolojik analizlerin hızla yapılması amacıyla geliştirilmiştir.

VITEK MS (bioMérieux, Fransa) kullanımı; önce numunelerden yukarıda anlatılan klasik mikrobiyolojik yöntemlere göre bakteri izolasyonu yapılmıştır. Tek kullanımlık steril öze ile şüpheli koloniden alınan az bir miktar “target” adı verilen cihaza ait metal plakalar üzerinde belirlenmiş alanlara düzgün ve homojen şekilde yayılarak kurumaya beklenmiştir.

Pozitif kontrol olarak plakanın ilgili alanına *E. coli* ATCC 8739 referans kontrol suşu bahsedilen şekilde yayılmış ve daha sonra örnekler ve pozitif kontrol suşu üzerine 1'er µL matriks (%50 “asetonitril” ve %2.5 “trifluoroasetik asid” içinde doymuş “α-cyano-4-hydroxycinnamic asid) eklenmiş ve plaka tekrar havada kurumaya bırakılmıştır. Örnekler hazırlandıktan sonra target olarak isimlendirilen plak VITEK MS, (bioMérieux, Fransa)” cihazına yüklenmiş ve işlem başlatılmıştır.

Cihaz yazılımı ana menüsüne giriş yapılarak, hazırlanan slayt barkodlanmış ve örneklerin olduğu alanlar işaretlenmiştir. Cihaz numunelerin yayıldığı her bir alana lazer atışları yapar ve ve örneğin molekülleri iyonize hale geçip cihazın tüpü içerisinde molekül ağırlığına göre uçmaya başlar. Dijital hale çevrilen veriler TOF (time of flight- uçuş zamanı) oluşturmak üzere biriktirilir ve cihaz içerisinde bulunan bir dedektör yardımı ile saptanır. Elde edilen verilerin analizi veritabanı ile analiz edilerek çalışılan mikroorganizmalar isimlendirilmişlerdir.

3.4. *L. monocytogenes* izolatları real-time PCR incelemesi

Mikrobiyolojik inceleme sonucu elde edilen şüpheli *L. monocytogenes* suşların real-time PCR yöntemiyle doğrulaması işlemine geçilmiştir.

3.4.1. DNA izolasyonu

Karakterizasyon için; moleküler SLAN®-96S marka Real-Time PCR cihazı kullanılmış ve Qiagen marka kit prosedürü takip edilerek amplifikasyon koşulları sağlanmıştır. QIAGEN marka, aynı test içinde 96 örnek çalışabilmekte ve testi 2,5 saat içinde tamamlayabilmektedir.

Şüpheli *L. monocytogenes* suşlarından DNA materyali Eurofins GENESpin DNA izolasyonu kiti (Eurofins GeneScan, Almanya) prosedürü uygulanarak elde edilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen genetik materyaller real-time PCR aşamasında kullanılmak amacıyla -20⁰C'de saklamaya alınmıştır.

Numune ve kontrol reaksiyon ayarlamaları yapılmıştır. İlk PCR aktivasyon aşaması için 95°C de 5dk HotStarTaq PlusDNA polimeraz aktivasyonu yapılmıştır. Sonra 3 aşamalı olarak döngü işlemi olmuştur ve bu işlemler ise; denatürasyon, tavlama ve uzatma işlemleridir. Denatürasyon 95°C de 15 sn, tavlama 60°C e 15 sn ve uzatma işlemleri ise 72°C de 10 sn'dir. 3 aşamalı döngü işlemi gerçekleşirken 60°C de veri toplama işlemi gerçekleşmiştir. Yeşil ışık 495/520 nm ve sarı ışık ise 524/557 nm yi ifade etmiştir. Sonuçlar cihazda görülen standart eğriye göre değerlendirilmiştir.

Ana karışım (master mix) 10 µl olarak hazırlanmıştır; üzerine 10 µl DNA eklenerek 20 µl son hacim elde edilmiştir. PCR tüplerine; 95°C'de 5 dakika, 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 15 saniye, 72°C'de 10 saniye olacak şekilde 40 döngü uygulanmıştır.



Şekil 3.4. DNA İzolasyonu Aşaması

3.4.2. Real-time PCR koşulları

L. monocytogenes şüpheli izolatların real-time PCR yöntemiyle doğrulaması için Qiagen QIASymphony mericon *L. monocytogenes* kiti prosedürü takip edilmiştir. Cihaz olarak SLAN®-96S model real-time PCR cihazı kullanılmıştır. Kitin solüsyon içerikleri ve real-time PCR amplifikasyon koşulları aşağıdaki Çizelgelerde sunulmuştur.

Çizelge 3.2: Real-time PCR kit solüsyonu içerikleri

İçerik	Örnek
Kırmızı pozitif kontrol DNA	20 reaksiyon
QuantiTect Nükleik Asit Dilüsyon Tamponu	1,5 ml
Enzimlerden Artılmış Su	1,9 ml
Mavi Multiplex PCR kit	2x130 µl

Çizelge 3.3: Real-time PCR amplifikasyon koşulları

İşlem Adı	Koşullar
İlk denatürasyon	95 ⁰ C/5 dk, 1 döngü
Denatürasyon	95 ⁰ C, 15 saniye
Primer bağlanması	60 ⁰ C, 15 saniye
Sentez	72 ⁰ C, 10 saniye

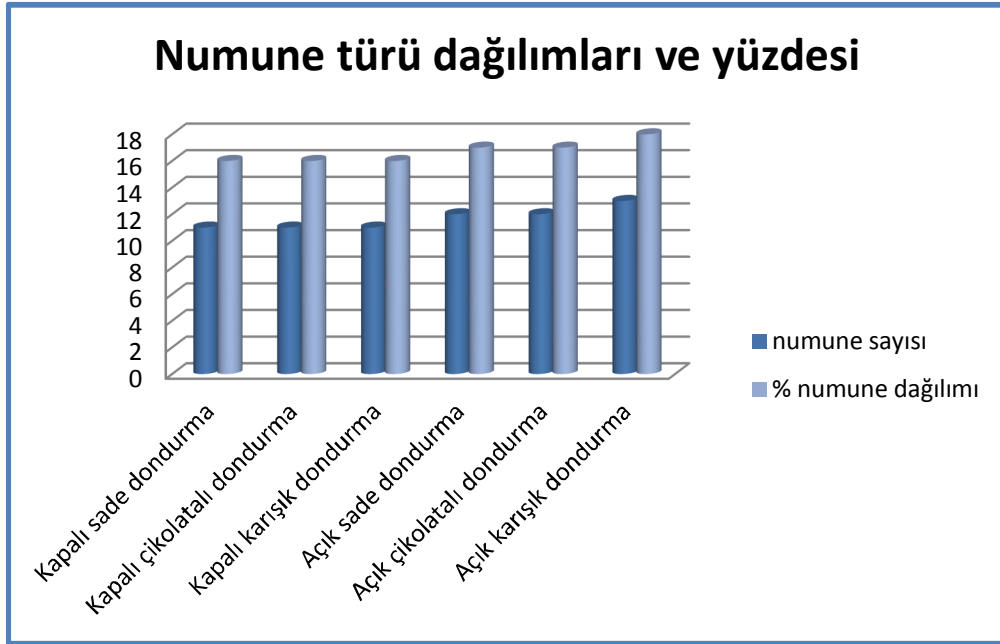
40 döngü

Hedef DNA için FAM dalgaboyu ışık (495/520 nm) ve internal kontrol amaçlı MAX dalgaboyu ışık (524/557 nm) seçilmiştir.

4.BULGULAR

İstanbul'un çeşitli bölgelerinden pastane, market, şarküteri vb. incelenen örneklerin bulunduğu yerlerden endüstriyel olarak ambalajlı şekilde üretilmiş veya geleneksel olarak üretilmiş ve açık satılan dondurmalarından en az 10'ar gr olmak koşulu ile 70 adet numune usulüne uygun olarak toplanarak, *Enterobacteriaceae* spp. ve *Listeria monocytogenes* varlığının saptanması amacı ile paralel numune çalışarak incelendi. Alınan örnekler 33 adet ambalajlı, 37 adet açık satılan dondurmalarından oluşmaktadır. Ambalajlı dondurmaların 11 adeti sade, 11 adeti çikolatalı, 11 adeti karışık dondurmadır; açık dondurmaların ise 12 adeti sade, 12 adeti çikolatalı, 13 adeti karışık dondurma olarak seçilmiştir.

Toplanan örneklerin dağılımı Çizelge 4.1' ve Çizelge 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.1: Numune Türleri Dağılımı

4.1. *Enterobacteriaceae* Bulguları

İncelenen 70 adet numune ile yapılan analiz ve doğrulama testleri sonucunda 35 adet numunede *Enterobacteriaceae* şüpheli izolat tespit edilmiştir. Yapılan sayımlara göre

ise bu izolatların toplamda 20 tanesi kodekse uygun değildir ve 300-66000 kob/g aralığındadır. Geri kalan 15 tanesi ise <10-60 kob/g aralığındadır yani kodeksin belirlemiş olduğu 10^2 kob/g limitine uygundur. Elde edilen sonuçlara göre ambalajlı dondurmaların 5 adedinin, açık satılan dondurmaların 15 adedinin Türk Gıda Kodeksi'nde belirlenmiş limit değerlerin üzerinde olduğu saptanmıştır. Uygun olmayan izolatlar VITEK-MS cihazına verilerek *Enterobacteriaceae*'ların hangi türleri olduğu saptanmıştır. VITEK- MS cihazında yapılan araştırmada 20 örneğin 7 tanesinde hem *Enterobacter cloacae* hem de *Enterobacter asburiae* türlerine rastlanmıştır. 1 tanesinde ise; *Klebsiella pneumoniae* türüne rastlanmıştır.

Çizelge 4.1: Numunelerin *Enterobactericea spp.* Sayım Sonuçları ve Spesifikasyonları

Numune Türü		Numune Sayısı (n)	Türk Gıda Kodeksi Limiti	Saptanan Değerler	Uygunsuz (Limit Dışı) Numune Sayısı
Ambalaj Türü	Dondurma Türü				
Ambalajlı	Sade dondurma	11	Max 10^2 cfu/g	17×10^2 cfu /g	1
	Çikolatalı dondurma	11		19×10^2 - 23×10^2 cfu /g	2
	Karışık dondurma	11		3×10^2 - $5,6 \times 10^2$ cfu /g	2
Açık	Sade dondurma	12		22×10^2 - 66×10^3 cfu /g	8
	Çikolatalı dondurma	12		$3,1 \times 10^2$ - $16,4 \times 10^2$ cfu /g	5
	Karışık dondurma	13		$4,7 \times 10^2$ - $8,1 \times 10^2$ cfu /g	2

Ambalajlı dondurmalarda *Enterobactericeae Spp.* 3×10^2 - 23×10^2 olarak bulunurken, açık satılan dondurmalarda $3,1 \times 10^2$ - 66×10^2 olarak saptanmıştır.

Belirlenen mikroorganizmaların bilgileri ise aşağıda belirtilmiştir;

Enterobacter cloacae; Koliform grubu, fakültatif anaerob, gram negatif, sporsuz ve laktozdan asit ve gaz oluşturan bakterilerdir. Gıdalarda koliform bakteri varlığı yetersiz ve yanlış pastörizasyon ve pişirme uygulamalarının veya yetersiz sanitasyon uygulamalarının bir göstergesidir (Çakır, 1999).

Enterobacter asburiae; Enterobacter üyelerinden, hareketsiz olup Klebsiella'lardan lizini (aminoasit) dekarboksile etme yeteneklerinin olmayışı ile ayrılırlar. İnsan sağlığını tehdit eden hastalık etkeni bir mikroorganizmadır (Bilgehan, 2000).

Klebsiella pneumoniae; özellikle üriner sistem enfeksiyonları, sepsisemi, pnömoni ve nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumludur (Winn ve ark., 2006).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre dondurmanın mikrobiyolojik özellikleri; dondurmanın 1 gramında en fazla 10^2 kob/g *Enterobacteriaceae* bulunabilmektedir (Anonim, 2011).

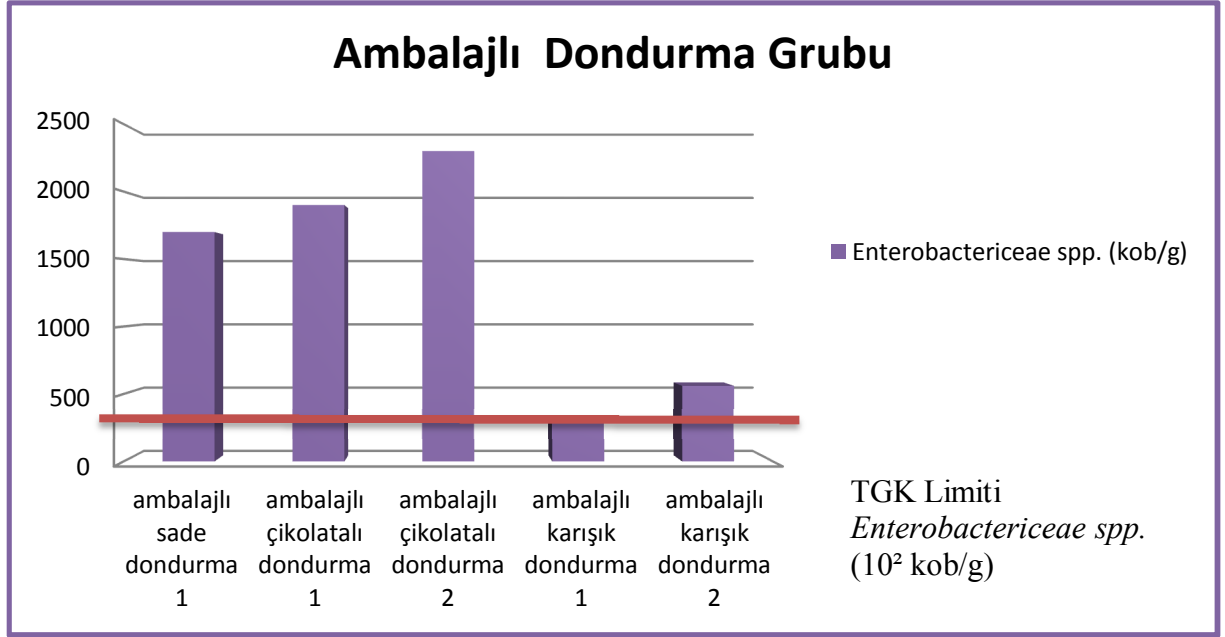
Çizelge 4.2: Limit Dışı Olan Ambalajlı Dondurma Örneklerinde Tespit Edilen *Enterobacteriaceae* Sayısı

Örnek	Ambalajlı dondurma <i>Enterobacteriaceae</i> (kob/g)
Sade	$1,7 \times 10^3$
Çikolatalı	$1,9 \times 10^3$
Çikolatalı	$2,3 \times 10^3$
Karışık	3×10^2
Karışık	$5,6 \times 10^2$

Çizelge 4.3: Limit Dışı Olan Açık Dondurma Örneklerinde Tespit Edilen *Enterobacteriaceae* Sayısı

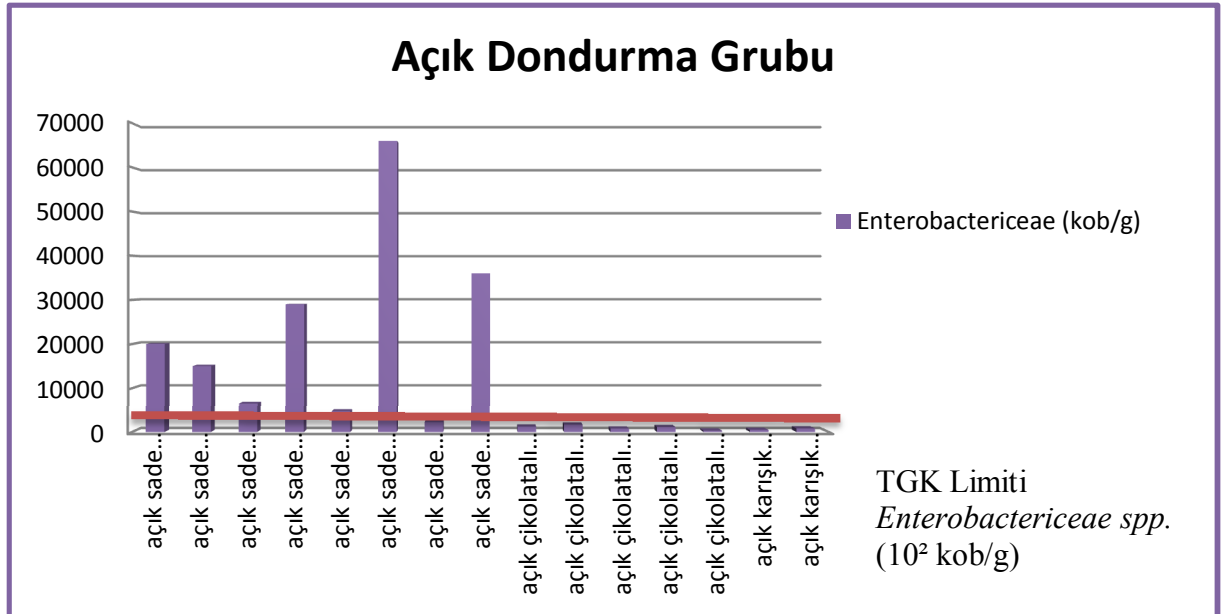
Örnek	Açık dondurma <i>Enterobacteriaceae</i> (kob/g)
Sade	2×10^4
Sade	$1,5 \times 10^4$
Sade	$6,5 \times 10^3$
Sade	$2,9 \times 10^4$
Sade	$4,6 \times 10^3$
Sade	$6,6 \times 10^4$
Sade	$2,2 \times 10^3$
Sade	$3,6 \times 10^4$
Çikolatalı	$12,2 \times 10^2$
Çikolatalı	$16,4 \times 10^2$
Çikolatalı	$7,6 \times 10^2$
Çikolatalı	$1,1 \times 10^3$
Çikolatalı	$3,1 \times 10^2$
Karışık	$4,7 \times 10^2$
Karışık	$8,1 \times 10^2$

Aşağıda Şekil 4.2.de ambalajlı dondurmalarındaki limite uygun olmayan *Enterobacteriaceae spp.* belirtilmiştir.



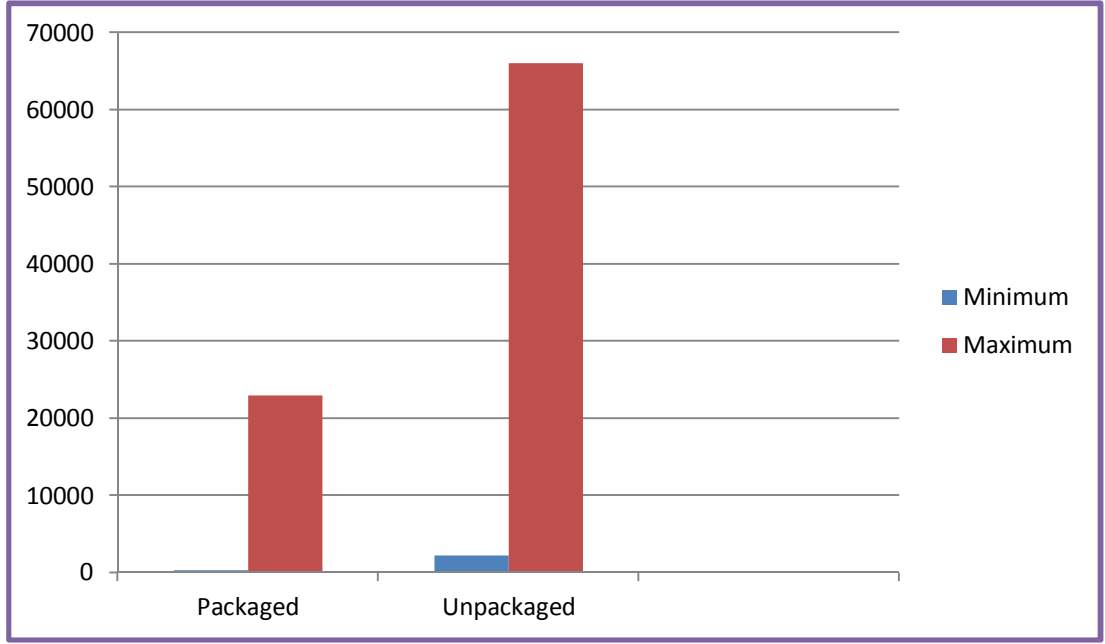
Şekil 4.2: Limit Dışı Olan Ambalajlı Dondurmalarda *Enterobacteriaceae spp.* sayım Bulguları

Aşağıda Şekil 4.3.de açık dondurmalarındaki Türk Gıda Kodeksi limitlerine uygun olmayan *Enterobacteriaceae spp.* belirtilmiştir.



Şekil 4.3: Limit Dışı Olan Açık dondurmalarda *Enterobacteriaceae spp.* Sayım Bulguları

Aşağıda Şekil 4.4 de Ambalajlı ve açık dondurmaların *Enterobacteriaceae Spp.* Sayıları Yönünden Karşılaştırılması grafik olarak belirtilmiştir.



Şekil 4.4: Ambalajlı ve Açık Dondurmaların *Enterobacteriaceae Spp.* Sayıları Yönünden Karşılaştırılması

4.2. *Listeria monocytogenes* Bulguları

Klasik mikrobiyoloji yöntemi ile incelenen 70 adet numuneden elde edilen toplam 10 adet *L. monocytogenes* şüpheli izolat VITEK-MS ile tiplendirilmiş ve devamında Real-time PCR ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan izolatlar VITEK-MS ile tiplendirilme yapılmış *L. monocytogenes* türüne raslanmamıştır. Ancak VITEK –MS ‘de izolatlardan 1 adet *Enterococcus faecalis* ve 1 *Listeria innocua* tanımlenmiştir. Şüpheli izolatlar yine Real-time PCR kiti prosedürü takip edilerek yapılan analiziyle hiç birinin *Listeria monocytogenes* olmadığı doğrulanmıştır.

Çizelge 4.4: Numunelerin *Listeria monocytogenes* Sayım sonuçları

Numune Türü		Numune Sayısı (n)	Türk Gıda Kodeksi Limiti	Saptanan Değerler	Uygunsuz (Limit Dışı) Numune Sayısı
Ambalaj Türü	Dondurma Türü				
Ambalajlı	Sade dondurma	11	0 cfu/25g	-	Uygundur
	Çikolatalı dondurma	11		-	Uygundur
	Karışık dondurma	11		-	Uygundur
Açık	Sade dondurma	12		-	Uygundur
	Çikolatalı dondurma	12		-	Uygundur
	Karışık dondurma	13		-	Uygundur

Belirlenen mikroorganizmaların bilgileri ise aşağıda belirtilmiştir;

Listeria cinsi 6 tür içermekte, bunlar; *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*'dir. Bunlar içinde sadece *Listeria monocytogenes* insanlara patojendir (Vazquez-Boland ve ark., 2001; Buchrieser ve ark., 2003; Swaminathan, 2001; Roche ve ark., 2009).

Enterococcus faecalis kolonileri, doğumdan kısa bir süre sonra tüm insanların bağırsak sistemlerinde bulunur. *Enterococcus faecalis* bireyde ciddi enfeksiyonlara neden olur. Bu mikroorganizma bağırsaklarda, cerrahi yaralarda, karın bölgesi ve doğum öncesi enfeksiyonlara ve iç kalp zarı iltihabına sebep olmaktadır (Key ve ark. 1997).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dondurma, besleyici değeri yanında hijyenik yönden uygun olmayan hammadde kullanımı, yetersiz üretim teknolojisi gibi sebeplerle patojen mikroorganizmaları veya bu mikroorganizmaların toksinlerini içerebilmektedir (Dubbertin ve Siems, 1975).

Süte; sağım, taşıma ve işleme sırasında bulaşan mikroorganizmaların dondurmalarda bulunması, dondurmanın patojen maddelerle bulaşıklığını, öncelikle ısı işleminin yetersiz yapıldığını, kullanılan malzemelerin sterilize edilmediğini, suyun bulaşık olduğunu ve aynı zamanda da hijyen kurallarına uyulmadığını gösterir. Bu bakteriler, dondurmada yapılan yetersiz pastörizasyon işlemlerinin veya pastörizasyon sonrası bulaşmanın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Karakuş, 1993).

Dondurma yapımında kullanılan farklı hammaddeler ve katkı maddeleri kullanımı aracılığı ile bazı mikroorganizmalar dondurmaya karşıabilirler. Pastörizasyon işlemi sporlar dışında zararlı bakterilerin etkisizleştirilmelerini sağlar. Ancak ısıl işleme rağmen hayatta kalan bakteriler oldukça patojen olan türlerdir (İnal, 1990).

İnsanların birçoğu, tüketilen gıdalarla birlikte aldıkları bazı bakterilerden dolayı gıda zehirlenmesine maruz kalmaktadır. Gıda zehirlenmesine neden olan bakterilerin çoğu doğada yaşamlarını sürdürmektedir. Tüketicie sunulan son ürünlerde mikroorganizmaların bulunma risklerini 3 temel alanda toplanabilir: Bunlar hammaddede doğal olarak bulunabilen mikroorganizmalar, üretim esnasında bulaşabilen mikroorganizmalar ve son ürünün ambalajlanması, depolanması veya taşınması esnasında bulaşabilen mikroorganizmalardır.

Fransa'da 2007 yılında (Kérouanton ve ark., 2007), Çin'de 2008 yılında (Zhang ve ark., 2008), Almanya'nın Baden-Württemberg şehrinde düğün sırasında tüketilen dondurmalar (Johler ve ark., 2013) ve son olarak yine Almanya'nın Freiburg şehrinde yapılan bir vaftiz töreni sonrası verilen kutlamaya katılan toplam 31 kişiden 13'ü tükettikleri çeşitli teze dondurmalar kaynaklı stafilokokal enterotoksinler nedeniyle hastaneye kaldırılmıştır (Fetsch ve ark., 2014).

Dondurmanın yüksek protein içeriği tehlikeli pek mikroorganizmanın çoğalması için en önemli şartlardan birisini oluşturmaktadır. Bu sebeple, enterotoksin üreten patojen mikroorganizmalar kaynaklı gıda zehirlenmeleri rapor edilmiştir.

Dondurmalarda *Stafilococcus aureus* kaynaklı infeksiyonlar ve gıda zehirlenmeler dışında bir diğer önemli patojen mikroorganizma ise *Listeria monocytogenes*'dir. *Listeria monocytogenes* ya da *Listeria* alt grupları kaynaklı olumsuz vakalara dondurmanın çokça tüketildiği gelişmiş ülkelerde de rastlanmaktadır.

Düşük sıcaklıklarda üreyebilmeleri ve dondurma üreticisi işletmelerinde de var olabilme ihtimali ile sıkıntı yaratan *Listeria spp.*, ortamda az olması sebebi ile de izolasyonları zor olan bakteri türüdür (Tekin, 2010). Buzdolabı sıcaklığında dahi gelişebilen; kurutma, ısıtma, dondurma ve soğutma işlemlerine rağmen bile canlılığını koruyabilen bir bakteri olması sebebi ile gıdalar arasında dondurmada bulunma riski oldukça yüksektir. Bu durumda gıda kaynaklı hastalıkların oluşabilmesine zemin hazırlamaktadır.

L. monocytogenes, ilk olarak 1926 yılında izole edilmesine rağmen günümüze kadar halk sağlığında önemini yitirmeyen gıda kaynaklı bir patojen bakteridir. Doğada geniş bir yayılım alanına sahiptir. Her türlü atık ve lağım suları, toprak, su, sebze ve hayvan yemleri bu alanların başında gelmektedir. *L. monocytogenes*, insanlara kontamine gıdaların tüketilmesi ile oral yoldan bulaşmaktadır. Bunun dışında; solunum, deri ve konjunktiva yol ile de bulaşma olabilmektedir.

Listeria spp., türü bakterilerinin sebep olduğu enfeksiyonların çoğu süt ile taşınmaktadır. Dondurmada süt ile üretilmesinden dolayı bir risk içermektedir. Süt, *Listeria* bakterilerini mide asidinin etkilerinden korur. Bu sebeple hastalığın bulaşmasında ve yayılmasında önemli etkisi vardır. *L. monocytogenes*, sütün içerisinde serbest olarak ya da yaygın bir şekilde bulunan lökositlerin içerisinde yer alır. *Listeria* bakterisinin hücre içi olması kendisini sütte bulunan imminoglobulin, lizozim, peroksidaz ve laktoferin gibi birçok substansa karşı koruyabilir. Bu özellik sebebi ile süte uygulanan pastörizasyon işleminde bile canlılığını koruyabilir, buzdolabı sıcaklığında üreyebilir ve gıdalar ile vücuda alınabilirler (Barza 1985, Doyle ve ark. 1987).

Farklı *Listeria* alt gruplarının özellikle sütler ve süt ürünlerinde görülme sıklıklarının yüksek oldukları bilinen bir gerçektir. Bu sebeple *Listeria monocytogenes* ve/veya

diğer *Listeria* türlerinin titiz ve hassas şekilde tespiti ve takibi gıda güvenliği ile halk sağlığı açılarından büyük önem taşımaktadır (Nayak ve ark., 2015). Geliştirilen ve artan şekilde rağbet göre tespit yöntemleri arasında otoanalizör sistemler ile DNA tabanlı moleküler yöntemler gelmektedir (Sharma ve ark., 2014; Nayak ve ark., 2015; Cloke ve ark., 2016).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre dondurmanın mikrobiyolojik özellikleri; dondurmanın 25 gramında *Listeria monocytogenes* bulunmamalıdır (Anonim, 2011).

Enterobacteriaceae insanlar ve hayvanlarda doğal bağırsak florasında bulunurlar. Üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, sindirim sistemi enfeksiyonları, menenjit gibi birçok hastalığın en önemli sebebidir (Tham, 2012). Gıdada sık izole edilen önemli türleri *E. aerogenes*, *E. cloacae* ve *E. asburiae*' dir (Ahmet ve ark., 1995).

Enterobacteriaceae bakterilerinin çiğ sütün yapısında bulunmaları, sütün bağırsak orjinli herhangi bir kaynak ile temas ettiğini ve aynı sütün her türlü hastalığa neden olabilecek mikroorganizmaları taşıdığını göstermektedir. Bazı dondurma üreticileri de dondurmaya üretim aşamasında iken pastörize süt kullanmak yerine çiğ süt kullanarak yapmaktadırlar. Bu durumda da *Enterobacteriaceae* bakterilerinin varlığı gıda ile direkt olarak vücuda girmekte ve halk sağlığını tehdit etmektedir (Altun ve ark., 2002).

Türkiye'de yapılan birçok çalışmada, piyasada satılan dondurmaların önemli düzeyde mikroorganizmalarla kontamine olduğu ve halk sağlığı tehdidi oluşturabileceği konusuna dikkat çekilmiştir.

Ülkemizde dondurmanın mikrobiyolojik kalitesini değerlendirmek üzere 1962-2000 yılları arasında İstanbul, Ankara, Elazığ, Kahramanmaraş ve Denizli illerinde çalışmalar yapılmıştır. Beş ilimizde yapılmış olunan 11 araştırmada farklı yapı özelliklerine sahip değişik nitelikteki dondurmalar üzerinde çalışılmıştır ve farklı dönemlerde yapılmış olunan bu çalışmaların tümünde yapmış olduğumuz çalışmaya paralel olarak mikrobiyolojik kalite açısından birden çok sorunla karşılaşıldığı ifade edilmiştir (Özer ve ark., 1962).

Erol ve ark. (1998), Ankara'daki çeşitli pastanelere ait 30'u vanilyalı, 26'sı çikolatalı ve 44'ü meyveli olmak üzere toplam 100 dondurma örneğini mikrobiyolojik açıdan

inceledikleri çalışmada; toplam aerobik mezofilik bakteri ve koliform sayıları sırasıyla vanilyalı dondurma örneklerinin % 63,2 ve % 73,1'inin; çikolatalı dondurma örneklerinin % 73,0 ve % 57,4'ünün; meyveli dondurma örneklerinin ise % 61,3 ve % 52,1'inin TSE'nin dondurma standardına uygun olmadığını saptamışlardır. Yaptıkları çalışmada inceledikleri örneklerin halk sağlığı açısından potansiyel risk oluşturabileceği sonucuna varmışlardır.

Mukan ve Evliya (2002) Adana'da satılan kaymaklı dondurmaların mikrobiyolojik kalitesini değerlendirme amaçlı olarak, çeşitli pastane, imalat ve satış noktalarından 24 dondurma numunesi alarak yaptıkları çalışmada, örneklerin %87,5'inde Koliform bakteri saptamışlar ve Adana'da satışa sunulan dondurmaların mikrobiyolojik kalitesini düşük bulmuşlardır.

Ağaoğlu ve Alemdar (2004), yaptıkları çalışmada, Van'da tüketime sunulan dondurmalarda halk sağlığı yönünden önem taşıyan bazı patojen bakterilerin varlığının araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada çeşitli pastanelerden sağlanan toplam 75 adet sade, çikolatalı ve meyveli dondurma örneklerinin mikrobiyolojik analizler sonucunda; % 8'inde *L. monocytogenes*, % 25,3'ünde *K. pneumoniae*, % 17,3'ünde *Salmonella* spp., % 13,3'ünde *E. coli* ve % 13,3'ünde *S. aureus* tespit etmişlerdir.

Patır ve ark. (2004), Elazığ'da açık olarak satışa sunulan kaymaklı (sade) ve meyve aromalı dondurmalarda koliformların türleri ile dağılımlarını inceledikleri çalışmada 50 adet kaymaklı ve 50 adet meyve aromalı (limonlu, kakaolu, fıstıklı, vişneli ve çilekli dondurmaların her birinden 10 adet) olmak üzere toplam 100 adet dondurma örneği almışlardır. Araştırma sonucunda örneklerde koliform sayıları, $<1,00 -5,74$ log₁₀ kob/g olarak bulunmuştur. Dondurma örneklerinden toplam 632 suş izole eden araştırmacılar kaymaklı dondurmalarından izole edilen 186 suşun 41'inin (% 22,04) *E. coli*, 89'unun *Escherichia* spp. (% 47,85), 45'inin *Citrobacter* spp. (% 24,19), 32'sinin *Enterobacter* spp (% 17,20) ve 20'sinin *Klebsiella oxytoca* (% 10,75) olduğunu saptamışlardır. Meyve aromalı dondurmalarından izole edilen 446 suşun 26'sinin (% 5,83) *E. coli*, 190'ının (% 42,60) *Enterobacter* spp., 103'ünün (% 23,09) *Escherichia* spp, 96'sinin (% 21,52) *Citrobacter* spp. ve 57'sinin de (% 12,78) *Klebsiella oxytoca* olduğunu tesbit etmişlerdir. Kaymaklı dondurmalarda *Escherichia* cinsinin, meyve aromalı dondurma örneklerinde ise *Enterobacter* cinsi bakterilerin daha yaygın olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada, Elazığ'da tüketime sunulan

dondurmaların özellikle *E. coli* ile *Enterobacter* spp. içermesi nedeniyle, ürünün hijyenik koşullarda yapılmadığını, dolayısıyla halk sağlığı açısından yeterli güvenceye sahip olmadığı saptanmıştır.

Bu çalışmaya benzer şekilde Akman ve ark. 2004 yılında Kahramanmaraş' tan temin ettikleri 28, Adana'dan temin ettikleri 30 adet dondurma olmak üzere 58 adet dondurma örneğini *Listeria* spp. varlığı yönünden incelemişlerdir. Kahramanmaraş ilinden alınan örneklerin 14'ünde, Adana ilinden alınan örneklerin 10'unda *Listeria* türlerinin varlığını belirlemişlerdir. Yapılan biyokimyasal tür tayininde 58 örnekten 22'sinin *L.grayi* ile, birer adedinin ise *L.innocua*, *L.welshimeri* ile kontamine olduğunu tespit ederlerken, bu çalışmaya paralel olarak örneklerin hiç birisinde *L.monocytogenes* bulunmadığını ifade etmişlerdir.

Bu çalışmaya benzer yöntem kullanarak Keskin ve ark. (2007), İstanbul ilinde 55 merkezden alınan 50 adet sade dondurma örneğinden, *S. aureus* varlığı açısından % 12,7'sinin (7 merkeze ait örnek) mikrobiyoloji tebliğine uygun olmadığını belirlemişlerdir.

Akarca ve Kuyucuoğlu (2008) Afyonkarahisar merkezindeki dondurma satış yerlerinden alınan 50 adet sade dondurma örneklerinden % 22'sinin toplam aerobik mezofil bakteri, % 44'ünün koliform bakteri ve % 22 'inin *S. aureus* sayıları yönünden Türk Standartları (TS) 4265 Dondurma Standardında ve Türk Gıda Maddeleri Tüzüğü Sade Dondurma Tebliğinde belirtilen sınır değerlerinin üzerinde olduğu belirlemişlerdir.

Çağlayanlar ve ark. (2009) Bursa'da satışa sunulan paketlenmiş (endüstriyel olarak üretilmiş, n=44) ve paketlenmemiş ve Bursa'daki pastanelerde üretilen dondurmaların mikrobiyolojik kalitesinin düşük olduğunu göstermiştir. Test edilen örneklerin hiçbirinde *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* spp. ye rastlanmamıştır. Paketlenmiş örneklerin tamamı, Türk Gıda Kodeksi'nin (TGK) kriterlerine uygundur. Paketlenmemiş örneklerin sırasıyla %9.1, %50.1, %63.6, %22.7 ve %36.4'ü TAMB, koliform, *E. coli*, maya ve küf sayıları bakımından TGK kriterlerine uygun değildir.

Çınar (2010) Tekirdağ İlinde satışa sunulan 30 adet sade ve 30 adet çilekli dondurmanın mikrobiyolojik özellikleri incelediği araştırmada *Enterobacteriaceae*

spp. sayısını $<1 -7,0 \times 10^5$ kob/g bulmuştur. Hiçbir örnekte *L. monocytogenes* edilememiştir.

Daha önce Türkiye'nin değişik zamanlarda ve değişik illerde yapılan birçok çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi Türk Gıda Kodeksi limitleri üzerinde *Enterobacteriaceae* spp. ve Koliform saptanmış olması kişisel hijyen yetersizliği, üretimde kullanılan hammaddeler (çiğ süt kullanımı, üretimde ve temizlikte kuyu suyu kullanımı, kontamine çeşni maddeleri vb kullanımı), yetersiz işletme hijyeni gibi çok değişik kaynaklardan dondurmalara bulaşabildiğini göstermektedir. Bizim İstanbul'daki çalışmamızda ve aynı şekilde Çağlayanlar ve ark. (2009) Bursa'da yaptığı çalışmada açık dondurma örneklerinde *Enterobacteriaceae* spp. sayısı ambalajlı dondurmalara göre daha yüksek bulunmuştur. Açık dondurmalar titizlikle üretilmiş olsa bile depolama ve hatta satış esnasında ek kontaminasyon riski taşımaktadır. Ayrıca küçük işletmelerde, yeterli hijyen ve sanitasyon bilgisine sahip olmayan kişiler tarafından, kalitesi belirsiz hammadde kullanarak ve genellikle standardize edilmemiş imalat metodlarıyla üretilen dondurmaların hijyenik açıdan daha fazla risk taşıdığı açıktır.

Diğer taraftan diğer Dünya ülkelerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde bu çalışma ile benzerlikler gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmaya benzer bir araştırma; Saludes ve ark. (2015) tarafından 2008 ve 2012 yılları arasında Şili'de yapılmıştır. Çalışmada Şili'nin muhtelif bölge ve şehirlerinden toplanan muhtelif gıda örnekleri arasında bu çalışmadan farklı olarak *Listeria monocytogenes* pozitif sonuç veren gıdaların %1'inin dondurma örneklerinden oluşturulduğu belirlenmiştir.

Nawal. Gh. ve ark.(1997) Amerika Birleşik devletleri'nde satılan dondurmalarda yaptıkları mikrobiyolojik incelemelerde *Listeria* türlerinin bulunma sıklığını %8 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışma da *Listeria* türlerinin bulunma oranı %1,42 olması ülkemizde kontaminasyon riskine daha çok önem verdikleri görülmektedir.

İstanbul'da satılan dondurmalarda rastlanmayan *Listeria monocytogenes* suşuna Cordano ve Rocourt (2001) Şili'de satışa sunulan dondurmalarda %3,5-7,4 oranlarında bulmuşlardır. Brezilya'da yürütülen bir diğer çalışmada ise incelenen dondurma örneklerinin hiç birisinden *Listeria* izolatları elde edilmemiştir (Abrahão ve ark., 2008).

Robinson (2005) yılında yaptıkları çalışmada; İngiltere, Galler, İskoçya ve Kuzey İrlanda'da satılan dondurmalarda *L. monocytogenes* bulunma oranını %26, Hindistan Bombay şehrinde açık satılan tüm dondurmalarda %100, Avustralya'da %13,9, Kosta Rika'da %2 ve son olarak 1999 yılı verilerine göre Türkiye'de %10 olarak bildirmiştir.

Farklı ürün grupları içeren, farklı firmalara ait toplam 70 analizde yapılan bu çalışma sonucunda, örneklerin yarısında *Enterobacteriaceae* bakterisine rastlanmıştır. Bu örnekler ise MALDI-TOF-MS prensibiyle çalışan VITEK-MS ile tiplendirilmiştir. Tespit edilen *Enterobacteriaceae*'lerin 15 tanesi limitlere uygundur ve bu durumda herhangi bir sorun bulunmamaktadır. Fakat 20 tanesi Türk Gıda Kodeksi'nin belirlemiş olduğu limitlere uygun değildir. Örneklerin hiç birisinde *L. monocytogenes* varlığına rastlanmamış olması da sorun teşkil etmemektedir. Fakat 1 adet *E. faecalis* bakterisi bulunması da insan sağlığını riske atabilecek duruma neden olabilmektedir. Bu durum ise fekal kontaminasyon göstergesidir.

Analizi yapılan dondurmalarda *L. monocytogenes* bulunmaması halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Buna karşın *Enterobacteriler* gıda güvenliği limitleri üzerinde bulunması henüz dondurmalarda gerekli koşulların yerine getirilemediği göstermektedir.

Çalışma sonucunda dondurmalarda *L. monocytogenes* tespit edilememesi; geçmişte yapılan çalışmalara bakıldığında üreticilerin gelişigüzel şekilde dondurma üretimi yaptığını fakat günümüzde daha dikkatli davranarak *L. monocytogenes* içermemesine önem verdiklerini ortaya koymuştur. Bunun yanında; geçmişte yapılan çalışmalarda dondurmalarda yine *Enterobacteriaceae spp.* bulunması ve bu çalışmada da aynı şekilde *Enterobacteriaceae spp.* bulunması hijyen açısından dondurma üretimine önem verilmediğini göstermektedir. Açık dondurmalarındaki *Enterobacteriaceae spp.* sayılarının, ambalajlı dondurmalara göre daha fazla olduğu da çalışma sonucunda ortaya konulmuştur. Bunun sebebi olarak ise; açık dondurmalarda hijyenik koşullara dikkat edilmemesi, çapraz kontaminasyon, fekal bulaşma olarak etki edebilmektedir.

Sonuç olarak; sütün bağırsak orjinli herhangi bir kaynak ile temas etmesi veya çapraz kontaminasyona uğraması ve bunun sonucunda da pastörizasyon işlemine tabii tutulmadan dondurma üretiminde kullanılması sonucu halk sağlığını tehdit etmekte olduğu sonucuna varılmıştır.

Günümüzde birçok çeşidi olan ve keyif ile tüketilen dondurmalarda üretim aşamasında dikkatsizliklerden dolayı çeşitli mikroorganizmalar içermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada da halk sağlığını etkileyecek oranda mikroorganizmaya rastlanmıştır.

Tüketicilerin dikkat etmesi gereken ise; doğal gıdalara ve bilindik markalara yönelmeleridir. Ambalajlı dondurmalarda belli bir raf ömrü hedeflendiğinden koruyucu kullanıldığı için patojen bakterilere rastlamak çok daha düşük bir orandır. Tüketicileri bu konuda bilinçlendirmek gerekmektedir.

Dondurma üretimi yapan üreticilere bir takım kısıtlamalar getirilmeli, devletin kontrol mekanizmaları da markası az duyulmuş veya açık dondurma üreticilerine denetim yapmaları gerekmektedir. Sonuç olarak tüketiciler bilinçsiz bir şekilde tüketime devam etmektedir.

KAYNAKÇA

- Abrahão, W.M., da Silva AbrahãoI, P.R., MonteiroI, C.L.B. ve Pontarolo, R.** Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, *Brazil. Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 44(2): 289-296, 2008.
- Ağaoğlu, S. Ve Alemdar, S.**, Van'da Tüketime Sunulan Dondurmalarda Bazı Patojenlerin Varlığının Araştırılması. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2): 59-64, 2004.
- Ahmet Z, Houang E, Hurley R.** Pyrolysis mass spectrometry of cephalosporin-resistant *Enterobacter cloacae*. *J Hosp Infect* 31:99, 1995.
- Akarca, G., Kuyucuoğlu, Y.**, Afyonkarahisar'da Satılan Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Çalışmalar. *Kocatepe Veterinary Journal*, 1(1), 2008.
- Akman, D., Duran, N. ve Dığrak, M.** Prevalence of *Listeria* Species in Ice Creams Sold in The Cities of Kahramanmaraş and Adana. *Turk J Med Sci*, 34: 257-262, 2004.
- Anonim**, Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliği, Tebliđ No:2004/45,4, 2004.
- Anonim**, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2011.
- Armani, G., Bertini, V. And Bendinalli, M.**, II. Controllo Batteriologico dei Gelati. *Indagine Svolta Nella Citta di Pisa. Riv. Ital. Lg.*25, 58-75, 1965.
- Arslan A, Gönülalan Z, Ateđ G, Güven A.** Determination of *Listeria*, *Salmonella*, *E.Coli Type 1* and *K.pneumoniae* in Ice Cream Samples Marketed in Elazig. *Turk. J. Vet. Ani. Sci.*; 20: 109-112, 1996.
- Barza M.** Listeriosis and Milk. *New England J. Medicine*;312(7): 438-440, 1985.
- Bilgehan H.** *Escherichia*. Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, klinik mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 2000, 10. baskı: Sayfa 3-17, 2000.
- Cartwright, E.J., Jackson, K.A., Johnson, S.D., Graves, L.M., Silk, B.J., Mahon, B.E.;** Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emerg. Infect. Dis.*, 19: 1–9, 2013.
- CDC.** (2011a): National Listeria Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
- CDC.** (2011b) National Listeria Surveillance Annual Summary, 2009. Atlanta Ga. US Dep. Health Hum. Serv. CDC.
- CDC.** (2013): National Listeria Surveillance Annual Summary, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
- Cloke, J., Evans, K., Crabtree, D., Hughes, A., Simpson, H., Holopainen, J., Wickstrand, N., Kauppinen, M., Leon-Velarde, C., Larson, N., Dave, K., Chen, Y., Ryser, E. ve Carter, M.** Method Modification Study for the Thermo Scientific SureTect™ *Listeria* Species Assay-Matrix Extension. *J AOAC Int*, 99(2):417-427, 2016.
- Cordano, A., M., Rocourt J.** Occurence of *Listeria monocytogenes* in food Chile. *International Journal of Food Microbiology* vol 70 issue 1-2 s:175-178, 2001.

Coşkun, F., Tekirdağ İlinde Satılan Sade ve Çilekli Dondurmalarda Fekal Kontaminasyonun Belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi,2(2):135-142, 2005.

Çakır İ. Koliform grup bakteriler ve *E. coli*, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları. Armoni Matbaacılık: Ankara, 1999.

Çağlayanlar, Gülben Erman, Buket Kunduhoğlu, and Nafi Çoksöyler. "Comparison of the microbiological quality of packed and unpacked ice creams sold in Bursa, Turkey." Cankaya University Journal of Law 12.2 (2009).

Çetinkaya, E. Ve Ayhan K., Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1): 53-62, 2012.

Çınar, E. Tekirdağ ilinde satışa sunulan sade ve çilekli dondurmaların bazı mikrobiyolojik özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.

Çiftçioğlu, G., Ülgen, M.T ve Bostan, K. An investigation on the presence of *Listeria monocytogenes* in ice cream. *İ.Ü Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18:1-8, 1992.

Dhanashree, B., Otta. Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, India. *Food Microbiology* vol 20, issue 4, s: 447, 2003.

Dığrak, M. Ve Özçelik, S., Elazığ'da Tüketime Sunulan Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi. *Gıda*,16(3):195-200., 1991.

Dığrak M, Tamıç H, Bağcı E, Kırbacı S. Kahramanmaraş'ta tüketime sunulan dondurmalarda *Listeria*, *Salmonella*, *E.coli* ve *K.pneumoniae*" nin araştırılması. *GIDA*; 25(5): 349-353,2000.

Dubbartin, S., Siems, H. Arch. Lebensmittelhygiene; 26: 110-115 ; In: Stengel, v.G. Ergebnisse bakteriologischer Untersuchungen von Speiseeis. *Milchwissensch.* 42(10):631-634, 1975.

Erdem B. Enterobacteriaceae. Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 1. baskı: sayfa 471-515, 1999.

Erol, İ., Küplülü, Ö., Sırıken, B. Ve Çelik, H., Ankara'daki Çeşitli Pastanelere Ait Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitelerinin Belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences.* 22: 345-52, 1998.

Farber Jm And Peterkin Pı. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev*; 55: 476-511, 1991.

Fetsch, A., Contzen, M., Hartelt, K., Kleiser, A., Maassen, S., Rau, J., Kraushaar, B., Layer, F. ve Strommenger, B. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. *Int J Food Microbiol*, 187:1-6, 2014.

Galsworthy Sb, Girdler S And Koval Sf. Chemotaxis in *Listeria monocytogenes* *Acta Microbiol.Hung.*; 37:81-85, 1990.

Gönülalan S., Kayseri İlinde Satışa Sunulan Dondurmaların *Listeria* Spp. Varlığı Yönünden İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, 2010.

Gunduz, G.T. ve Tuncel, G. (2006): Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 89(3-4):329-336.

Icmsf, Milk and Milk Products. "Microbial Ecology of Foods Vol. 2. Food Commodities" International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Academic Press, London, 1980.

Ivanek R, Gröhn Yt. And Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* in Multiple Habitats and Host Populations: review of Available Data for Mathematical Modeling. *Foodborne Pathogens and Disease*; 3(4): 319-336, 2006.

ISO-11290-1, Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*, Part 2: Enumeration method, International Organization for Standardization, Geneva, 1998.

ISO 21528-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. Part 2-Colony-count, 2004.

İnal, T., Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi. Final Ofset, İstanbul, 1093, 1990.

Jaleli, M., Abedi, D., Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. International Journal of Food Microbiology vol 122, issue 3 s:336-340. Jenkinson, F.; Lapin-scott, H.M. 2000. Biofilms adhere to stay. Trends Microbiol. 9:9-10, 2008.

Johler, S., Tichaczek-Dischinger, P.S., Rau, J., Sihto, H.M., Lehner, A., Adam, M. ve Stephan, R. (2013): Outbreak of Staphylococcal food poisoning due to SEA-producing *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog Dis.*, 10(9):777-781.

Karakuş, M. Gıda sanayiinde mikrobiyoloji ve uygulamaları. TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gebze-Kocaeli: Gıda ve Soğutma Teknolojileri Bölümü, 1993.

Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. ve De Buyser, M.L. (2008): Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol*, 115(3):369-75.

Keskin, Y., Başkaya, R., Özyaral, O. Ve Kıyan, P., Sade Dondurmaların Mikrobiyolojik İncelenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 37 (1) : 51-58, 2007.

Key, W., J.D. Denoon, S. Boyles. *Enterococcus faecalis* genome sequenced. Disease Weekly Plus. 22p., 1997.

Kon, S. K., Milk and Milk Products in Human Nutrition. Food and Agriculture Organization Of The United Nations, 2, 41-42, 1972.

Mclauchlin J, Hall S M, Velani S K Et Al. Human Listeriosis and paté: A possible association, Brit. Med. J.; 303: 773-775, 1991.

Mclauchlin J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. Food Control; 7: 187-193, 1996.

Mcpherson Mj, Moller Sg. The Basics. New York: Cromwell Press; 1-45, 2000.

Molla, B., Yılma, R., Alemayehu, D. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail meat and milk products in Addis Ababa, Ethiopia. Ethiop. J. Health Dev. Vol.18 (3) s: 208–212, 2004.

Mukan, M, Evliya, B. "Adana Piyasasında Tüketime Sunulan Sade-Kaymaklı Dondurmalarının Mikrobiyolojik Kalitelerinin Tüketici Sağlığı Açısından Değerlendirilmesi." Gıda Dergisi 27.6, 2002.

Nayak, D.N., Savalia, C.V., Kalyani, I.H., Kumar, R. ve Kshirsagar, D.P. (2015): Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods. Vet World (2015): 8(6):695-701.

Nawal, G, Khalil, Bastawrows, A.F. Isolation of *Listeria Species* from Raw Milk and some Dairy Products . Animal Health Research Laboratory, Assiut .Assiut Vet. Med. J. Vol. 36 No 72, January 1997.

Or, F., Kahramanmaraş'ta Üretilen Maraş Usulü Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitelerinin Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, 2009.

Ozturk, I., Golec, A., Karaman, S., Sagdic, O. ve Kayacier, A. (2010): Evaluation of *Listeria monocytogenes* survival in ice cream mixes flavored with herbal tea using Taguchi method. *Foodborne Pathog Dis.*, 7(10):1263-1267.

- Özer İ, Bozkurt M, Başdurak M, Keskin S.** Ankara pastane ve dondurmacılarında satılan kaymaklı dondurmaların bakteriyolojik tayin amacıyla yapılan bir ön çalışma . *Türk Vet Hek Dern Derg.* 1962 ; 32 :347-52 .
- Patır, B., Öksüztepe, G. ve İlhak, İ.,** Elazığ'da Tüketime Sunulan Kaymaklı (sade) Dondurmaların Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kalitesi. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 20 (1): 23-29, 2004.
- Reist M, Geser N, Hachler H, Scharrer S, Stephan R.** ESBL-Producing *Enterobacteriaceae*: Occurrence, Risk Factors for Fecal Carriage and Strain Traits in the Swiss Slaughter Cattle Population Younger than 2 Years Sampled at Abattoir Level. *PLOS ONE* 8(8): e71725. doi:10.1371/journal.pone.0071725, 2013.
- Ricci, N., Manuppella, A., Laurelli, T., Durante, M., Trillo, P. Ve Simeone, R.,** Case of Food Poisoning from Locally Produced Ice Cream, Attributable to a Rare Salmonella Serotype, *Salmonella uganda*, *FSTA Abs.* 24 (9): 201, 1992.
- Rıfaat E.A., Tekiner İ.H. ve Özpınar H.,** Halk Sağlığı Açısından İçme ve Kullanma Sularında Koliform ve Fekal Koliform Bakterilerin Varlıklarının Klasik ve MASS Spektrometresi Yöntemleriyle İncelenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(2):20-32, 2014.
- Ryser Et, Marth Em.** *Listeria, Listeriosis and food safety.* Marcel Dekker, New York, 1991.
- Robinson, R. K.,** *Microbiology of Frozen Dairy Paroduct,* Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Crown House, Linton Road, Barking, Essex IG118JU, England, 6: 223-230, 1985.
- Rothwell, J.,** *Microbiology of Ice Cream and Related Products.* Dairy Microbiology, (Ed). R.K. Robinson, Vol.2, 2nd ed., Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London and New York, 409 p.”, 1990.
- Saldamlı, T. Ve Temiz, A.,** 1988. Ankara'da Tüketime Sunulan Maraş Dondurmalarının Kaliteleri Üzerinde Araştırmalar. *Sütçülük Dergisi*, 2, 1988.
- Saludes, M., Troncoso, M. ve Figueroa, G.** (2015): Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. *Food Control*, 50: 331–335.
- Sharma, N., Bambusch, L., Le, T. ve Morey, A.** (2014): InstantLabs *Listeria monocytogenes* food safety kit. Performance tested method 051304. *J AOAC Int.*, 97(3):852-861.
- Seeliger Hpr And Bockemühl J.** Kritische Untersuchungen zur Frage einer Kapselbildung bei *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakteriöl. Parasit. Infekt. Hyg. I.* Orig; 206: 216-217, 1968.
- Siqueira Jf, Roças In.** PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent*; 31(5): 333-339, 2003.
- Tekinşen, O. C.,** *Dondurma Teknolojisi.* Tübitak Yayınları No:632, UHAB Seri No:22, Ankara, 44, 1987.
- Tekinşen, O. C.,** *Süt Ürünleri Teknolojisi.* 3.Baskı. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 329, 2000.
- Tham J.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: epidemiology, risk factors, and duration of carriage. Sweden: *Department of Clinical Sciences/Malmö Infectious Disease Research Unit/Lund University*, 2012.
- Töreci K.** *Escherichia* türleri. Ayşe Willke Topçu, Güner Söyletir, Mehmet Doğanay, infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapçevleri, cilt 2,: sayfa 1564-1574, 2002.
- Unat Ek.** *Escherichia coli.* Prof. Dr. Ekrem Kadri Unat, Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi, *Dergah Tıp yayınları*, ikinci baskı, cilt 1: sayfa 546, 1986.

Vazquez-Boland, A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. Ve Kreft, J., Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14, 584–640, 2001.

Wade Jj, Desai N, Casewall Mw. Hygienic hand disinfection fort he removal epidemic vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and gentamisin resistant Enterobacter cloacae, *J Hosp Infect* 18:211, 1991.

Walker J., Douan G., DNA probes: A new role in diagnostic microbilology. J Appl Microbiol, 67:229-230, 1989.

Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Et Al. (Eds). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Chapter 5-6. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 2006.

Yöney, Z., Dondurma Teknolojisi. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları 360, A.Ü. Basımevi, Ankara, 110, 1968.

Zhang, Y.J., Xu, D.G., Fang, Y.Z., Gong, P., Zhu, M. ve Bao, F.Z. (2008): Tracing to the source of *Staphylococcus aureus* isolates from ice cream. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 42(7):499-501.

ÖZGEÇMİŞ

VOLKAN ABDÜNNUR

Adres: İST. E-MAİL: volkan_abdunnur@hotmail.com

Cep Telefonu: (530) 9447417

Doğum Tarihi-Yeri: 15.07.1990- İstanbul/Bakırköy

Eğitim Durumu: Gıda Mühendisi

Bitirdiği okullar :İlköğretim 1996-2004

:Lise 2004-2007

İstanbul Aydın Üni.

Mühendislik-Mimarlık Fakültesi

Gıda Mühendisliği (2009-2014)

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Güvenliği ve Beslenme Anabilim Dalı (2014-2016)

Stajlar

Eurolab Gıda ve Laboratuvar Hizmetleri Dış. Tic. Aş – Lab. Stajı

The Green Park Hotels & Resorts – İşletme Stajı

Sertifika-Konferans-Başarılar

Certificate of Achievement From The Gıda Mühendisliği Department 30 Week ELT Program At The Upper-Intermediate (CEFR- B2) Level - 2010

ISO 22000: 2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi İç Tetkikçi – 2011

ISO 22000: 2005 Food Safety Management System Internal Auditor - 2011

ISO 22000: 2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Ve Dokümantasyon – 2011
ISO 22000: 2005 Food Safety Management System Basic and Documentation - 2011
Giriřimcilik ve Liderlik Sertifikası – 2012
Kariyer Yönetimi ve Kariyer Belirleme Sertifikası – 2012
Bireysel ve Kurumsal Rekabet Yönetimi Sertifikası – 2012
ISO 9001 (İç Tetikçi) İç Denetçi Sertifikası – 2015
OHSAS 18001 İş Sağlığı ve Güvenliği Sertifikası – 2015
ISO 22000 HACCP Sertifikası – 2015
ISO 14001 Çevre Yönetim Sistemi Sertifikası - 2015