

MERCK

GIDA MİKROBİYOLOJİSİ UYGULAMALARI

Editör: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Ankara, 2005

ISBN : 975-00373-0-8

Bu kitabın tüm yayın hakları www.mikrobiyoloji.org adına; ana sponsor olan Orlab Laboratuvar Market'e aittir.

Ticari değeri yoktur, satılamaz. İsteyene kargo ücretini üstlenmek kaydı ile basılı kitap ve/veya pdf formatında CD olarak gönderilmektedir.

Fotokopi ile çoğaltılabilir, www.mikrobiyoloji.org sitesinden ücretsiz olarak indirilebilir.

Kaynak gösterilerek kullanılabilir.

Anonymous, 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa.

İsteme adresi: kitap@mikrobiyoloji.org

1. Baskı: 5.500 adet

Ekim, 2005

Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara

Önsöz

Merck Gıda Mikrobiyolojisi adlı dosyanın www.mikrobiyoloji.org sitesinde elektronik ortamda yayınlanmasından kısa bir süre sonra meslektaşlarımızdan yoğun bir şekilde basılı kitap olarak yayınlanması talepleri gelmeye başladı. Elektronik ortamdaki dosyanın aynısının basılması söz konusu değildir. Bununla birlikte, adı geçen dosyadaki bilgi birikimi de küçümsenemez. Sonuçta konunun sahibi olan gıda mikrobiyologları tarafından söz konusu dosyanın yeni baştan düzenlenerek basılı kitap haline dönüştürülmesine karar verildi, biz de buna uyduk. Bu arada elektronik ortamdaki dosyaya pek çok yeni bölüm de eklendi. Meslektaşlarımıza gıda mikrobiyolojisinin tümü üzerindeki son gelişmeler ve güncellemeler için www.mikrobiyoloji.org sitesini izlemeleri gerektiğini burada da hatırlatmak isteriz.

Bu kitabın yazarlarından bir kısmı, yüksek lisans öğrencisinden profesöre uzanan dağılımda üniversite personeli iken, asla küçümsenmeyecek bir kısmı ise gıda sanayisinde çalışan teknisyenden Ar-Ge sorumlusuna kadar değişen laboratuvar personelidir. Böylece, kitaba akademik ve sanayi düzeyinde katkı sağlanmıştır.

Öncelikle; bu aşamada 24 farklı yazardan gelen bilgilerin derlenmesi ve kitaba doğrudan katkıları nedeniyle Prof. Dr. A. Kadir Halkman'a ve kendisinin şahsında tüm yazarlar ile kitabın bu şekilde basılıp dağıtılmasını sağlayan ana sponsorumuz Orlab Laboratuvar Market'e içtenlikle teşekkür ediyoruz

Bu çalışmada belirli bölümlerde tekrarlar vardır. Bunlar, gözden kaçırılmış değil, kasten yapılmış tekrarlamalardır. Bunun nedeni, özellikle sanayiden gelen istek doğrultusunda bölümlerin bağımsız olarak da ele alınmasıdır. Benzer şekilde, yaşayan dil kullanılması amacıyla kimi yerde daha yeni kelimeler, bazı yerlerde ise daha eski kelimeler seçilmiştir. Besiyeri ve kimyasal madde adlarının İngilizce şekli ile bırakılması çoğu yerde benimsenmiştir.

Kitap ile ilgili her türlü eleştiri ve katkılarınızı kitap@mikrobiyoloji.org adresine bildirmeniz halinde, bunlar gerek kitabın daha sonraki baskılarında gerek elektronik ortam dosyasında dikkate alınacaktır.

Yararlı olmasını diliyor ve bu kitabı, gıda mikrobiyolojisi için bir ışık yakmış, yakan ve yakacak olan tüm gıda mikrobiyologlarına atfediyoruz.

Sevgiyle, bilgiyle

www.mikrobiyoloji.org

Ekim 2005, Ankara

Kısaltmalar	Açıklama
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATCC	American Type Culture Collection
CASO	Casein Soy Peptone Tryptic Soy (Broth, Agar)
CCDA	Charcaol Cefoperozone Deoxycholate Agar Base, modified
CT	Cefixime–Telurite (SMAC Agar katkısı)
DG–18 Agar	Dichloran Glycerol Agar
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
DRCM	Differential Reinforced Clostridial Broth
EMS	En Muhtemel Sayı (sayım sonucunda)
EPA	Environmental Protection Agency (USA)
FDA	Food and Drug Administration
GSP Agar	Glutamate Starch Phenol red Agar
IDF	International Dairy Federation
IFU	International Federation of Fruit Juice Producers
ISO	International Organization for Standardization
kob	Koloni Oluşturan Birim (sayım sonucunda)
LEB	Listeria Enrichment Broth acc. to FDA/IDF
LST	Lauryl Sulfate Tryptose (Broth)
MR	Metil Red
MRD	Maximum Recovery Diluent
MSRV	Modified Semi solid Rappaport Vasiliadis Medium
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -Glucuronide
MUP	4-Methylumbelliferylphosphate
OGYE	Oxytetracycline- Glucose-Yeast Extract Agar
ONPG	ortho nitrophenyl- β -galactopyranoside
PCA	Plate Count Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
RBC Agar	Rose Bengal Chloramphenicol Agar
RVS Broth	Rappaport Vassiliadis Soy Broth
SMAC Agar	Sorbitol MacConkey Agar
TCBS Agar	Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar
TSC Agar	Tryptose Sulfite Cyclocerine Agar
TSYE Agar	Tryptone Soya Yeast Extract Agar
USDA	United States Department of Agriculture
USP	United States Pharmacopoeia
VP	Voges Proskauer
VRB(L)	Violet Red Bile -Lactose- (Agar)
VRBD	Violet Red Bile Dextrose (Agar)
XLD Agar	Xylose Lysine Deoxycholate Agar
YGC	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar

İ Ç İ N D E K İ L E R *

Önsöz	iii
Kısaltmalar	iv
İçindekiler	v
Çizelgeler	vii
Şekiller	vii
Ek A. Şemalar	viii
Ek B. Besiyerleri ve Mikroorganizma Fotoğrafları	ix
1. Bölüm; Genel Bilgiler	1
01. Neden MERCK Besiyerleri?	1
02. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı; Genel Kurallar	5
03. Besiyerleri	9
04. Sterilizasyon	57
05. Örnek Alma, Homojenizasyon ve Seyreltme	73
06. Ekim ve İnkübasyon	85
07. Mikroorganizma Analiz Yöntemleri	89
08. Yıkama	125
09. Kültür Koleksiyonu ve Otokontrol	127
10. Stok Takibi ve Analiz Ekonomisi	131
2. Bölüm; Mikroorganizma Analizi	135
11. Toplam Bakteri	135
12. Koliform Grup Bakteriler	141
13. Fekal Koliform Bakteriler	151
14. <i>Escherichia coli</i>	155
15. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Serotipi	167
16. Toplam Enterobacteriaceae	171
17. Maya-Küf	175
18. <i>Staphylococcus aureus</i>	181
19. <i>Salmonella</i>	187
20. <i>Listeria monocytogenes</i>	193
21. <i>Clostridium</i> spp. ve <i>Cl. perfringens</i>	199
22. Enterokoklar	203
23. <i>Bacillus cereus</i>	205
24. <i>Yersinia enterocolitica</i>	209
25. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	211
26. <i>Aeromonas</i> Türleri	213
27. <i>Campylobacter</i>	215
28. <i>Alicyclobacillus</i>	217
29. <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	221

* İçindekiler bölümü sadece ana hatları göstermektedir. Pek çok bölümde o bölüm ile ilgili tam bir "dizpozisyon" vardır.

30. Anaeroblar	223
31. Lipolitik Bakteriler	227
32. Proteolitik Bakteriler	229
33. Rop Sporu	231
34. Laktobasiller	233
35. <i>Pseudomonas</i>	237
3. Bölüm; Tanımlama Testleri	239
36. İzolasyon ve Tanımlama Esasları	239
37. Basit Biyokimyasal Testler	243
38. Mikroskopik Tanımlama	253
4. Bölüm; Besiyerleri, Katkılar ve Diğer Malzeme	255
39. Seyreltme Çözeltileri	255
40. Genel Kullanım	257
41. Toplam Bakteri Analiz Malzemesi	261
42. Koliform Grup Bakteriler Analiz Malzemesi	262
43. Fekal Koliform Bakteriler Analiz Malzemesi	267
44. <i>E. coli</i> Analiz Malzemesi	268
45. <i>E. coli</i> O157:H7 Serotipi Analiz Malzemesi	273
46. Toplam Enterobacteriaceae Analiz Malzemesi	276
47. Maya-Küf Analiz Malzemesi	276
48. <i>Staphylococcus aureus</i> Analiz Malzemesi	282
49. <i>Salmonella</i> Analiz Malzemesi	285
50. <i>Listeria monocytogenes</i> Analiz Malzemesi	293
51. <i>Clostridium perfringens</i> Analiz Malzemesi	298
52. Enterokok Analiz Malzemesi	301
53. <i>Bacillus cereus</i> Analiz Malzemesi	302
54. <i>Yersinia enterocolitica</i> Analiz Malzemesi	304
55. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Analiz Malzemesi	305
56. <i>Aeromonas hydrophila</i> Analiz Malzemesi	306
57. <i>Campylobacter</i> Analiz Malzemesi	308
58. <i>Alicyclobacillus</i> Analiz Malzemesi	311
59. <i>Clostridium tyrobutyricum</i> Analiz Malzemesi	311
60. Anaeroblar için Analiz Malzemesi	313
61. Lipolitik Bakteriler Analiz Malzemesi	319
62. Proteolitik Bakteriler Analiz Malzemesi	320
63. Rop Sporu Analiz Malzemesi	320
64. Laktobasil Analiz Malzemesi	321
65. <i>Pseudomonas</i> Analiz Malzemesi	322
Kaynakça	323
İndeks; Genel	329
İndeks; Besiyerleri	331
Ek A. Analiz Şemaları	335
Ek B. Besiyeri ve Mikroorganizma Fotoğrafları	349

Çizelgeler

Çizelge 01. Tampon çözelti hazırlanması	25
Çizelge 02. pH İndikatörleri ve Renk Değişim Sınırları	25
Çizelge 03. Glossary	36
Çizelge 04. Sıcaklık–Basınç Dönüşümü	60
Çizelge 05. D Değeri	72
Çizelge 06. EMS Çizelgesi	103
Çizelge 07. EMS Sonuç Örnekleri	109
Çizelge 08. Titre Belirlenmesi için Örnek	113
Çizelge 09. Ekonomik Kıyas	131
Çizelge 10. <i>Listeria</i> Türlerinin Ayrımı	195

Şekiller

Şekil 01. Tartım Sırasında Havada Toz Dağılımı	2
Şekil 02. Yatık Agar Hazırlanması	16
Şekil 03. Roux Şişesi	16
Şekil 04. Durham Tüpü	17
Şekil 05. Petri Kutularının Kurutulması	45
Şekil 06. Toplam Isı Girişi	61
Şekil 07. D Değeri Grafiği	72
Şekil 08. Seyreltme Tekniği ile Ekim	80
Şekil 09. Drigalski Spatülü	90
Şekil 10. Dökme Yöntemi Uygulanışı	92
Şekil 11. Yayma Yöntemi Uygulanışı	93
Şekil 12. Tüp Seyreltme Yöntemi	101
Şekil 13. EMS Yönteminde Kod Kavramı	102
Şekil 14. EMS Yönteminin Uygulanışı	106
Şekil 15. Sıvı bir gıdada <i>E. coli</i> 'nin IMViC testleri ile belirlenmesi	108
Şekil 16. Howard Lamı için Tipik Domates ve Küf Görüntüleri	116
Şekil 17. Canlandırma Yöntemi ile Enterobacteriaceae Sayımı (EMS)	119
Şekil 18. Var/yok Testleri	120

Ek A. Analiz Şemaları

A 01. Toplam Mezofil Aerob Bakteri Sayımı	335
A 02. Koliform Bakterilerin Sayılması; Katı Besiyeri Yöntemi	336
A 03. Koliform Bakterilerin Sayılması; EMS Yöntemi	337
A 05. Membran Filtrasyon Yöntemi	338
A 04. 100 mL Suda Koliform Bakteri ve <i>E. coli</i> Aranması	339
A 06. <i>E. coli</i> Sayılması; Katı Besiyeri	340
A 07. <i>E. coli</i> Sayılması; Hızlı EMS Yöntemi	341
A 08. Singlepath <i>E. coli</i> O157 Test Kiti Uygulama Şeması	342
A 09. Singlepath Verotoksin Test Kiti Uygulama Şeması	343
A 10. Salmonella Aranması	344
A 11. Singlepath Salmonella Test Kiti Uygulama Şeması	345
A 12. Listeria Aranması	346
A 13. Singlepath Listeria Test Kiti Uygulama Şeması	347
A 14. Singlepath Campylobacter Test Kiti Uygulama Şeması	348

www.mikrobiyoloji.org

Ek B. Besiyerleri ve Mikroorganizma Fotoğrafları

B 01. VRB Agar	349
B 02. Brilliant Green Bile Broth'da gaz oluşumu	349
B 03. Chromocult Coliform Agar	349
B 04. Chromocult Coliform Agar ES	349
B 05. LMX Broth	349
B 06. Lactose TTC Agar	349
B 07. Envirocheck Contact C	350
B 08. UV El Lambası	350
B 09. Fluorocult VRB Agar	350
B 10. Chromocult TBX Agar	350
B 11. İndol testi	350
B 12. Fluorocult LST Broth	350
B 13. ReadyCult Coliforms	351
B 14. Fluorocult LMX Broth	351
B 15. SMAC Agar	351
B 16. YGC Agar	351
B 17. Baird–Parker Agar	351
B 18. Giolitti–Cantoni Broth	351
B 19. Brilliant Green Phenol Red Agar	352
B 20. Rambach Agar	352
B 21. XLD Agar	352
B 22. XLT Agar	352
B 23. MSRV Medium	352
B 24. Diasalm Medium	352
B 25. PALCAM Agar	353
B 26. Oxford Agar	353
B 27. TSC Agar	353
B 28. TSC Agar (floresan)	353
B 29. ReadyCult Enterococci	353
B 30. m- Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley	353
B 31. MYP Agar	354
B 32. CIN Agar	354
B 33. CIN Agar	354
B 34. TCBS Agar	354
B 35. m-Aeromonas Selective Agar	354
B 36. mCCDA	354
B 37. BAT Agar	355
B 38. MRS Agar	355
B 39. Cetrimide Agar	355
B 40. A1 Broth	355
B 41. Antibiotic Sulfonamide Sensitivity–test Agar (ASS Agar)	355
B 42. Arginine Broth acc. to Schubert	355

B 43. Bismuth Sulfite Agar acc. to Wilson-Blair	356
B 44. Bolton Selective Enrichment Broth	356
B 45. Brolacin Agar (Bromothymol–blue Lactose Cystine Agar)	356
B 46. Calcium Caseinate Agar acc. to Frazier and Rupp, modified	356
B 47. CATC Agar (Citrate Azide Tween® Carbonate)	356
B 48. Chapman Agar (Staphylococcus Selective Agar No. 110)	356
B 49. CYE–Agar	357
B 50. DNase Agar	357
B 51. EMB Agar	357
B 52. Endo Agar	357
B 53. Lysine Iron Agar	357
B 54. Malt Extract Agar	357
B 55. OGY Agar	358
B 56. Orange Serum Agar	358
B 57. Potato Dextrose Agar	358
B 58. Pseudomonas Agar F	358
B 59. Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar	358
B 60. Sterikon biyoindikatör	358



01. Neden MERCK Besiyerleri?

ISO 11133'e Yegane Uyum

MERCK besiyerlerinin en önemli özellikleri arasında ISO 11133 sayılı standarda uyum gelmektedir. Bu standarda göre üretim yapan yegane besiyeri markası MERCK'tir. Buna göre her parti besiyeri performans testinden geçirilmektedir. Bu kitabın baskıya hazırlandığı 2005 Eylül tarihinde, başka hiç bir besiyeri markası ISO 11133'e uyum gösterdiğini henüz belgeleyememiştir.

ISO 11133 sayılı standart basit olarak, her parti ürünün kontrolünü ve genel olarak ürünün standart kalitesini sağlamaktadır. Testlerde kullanılan mikroorganizmaların stok, ana ve kullanma kültürü olarak korunması, geri alma testlerinin "iyi" ve "çok iyi" gibi göreceli belirmelerle değil, doğrudan sayısal değerlerle gösterilmesi gibi göz ardı edilemez pek çok ayrıntı vardır. Bu standartta; her parti besiyerinin kabul edilebilir kalitesi, besiyerinin amaca uygunluğu ve besiyerinin uyumlu sonuçlar sağlaması üzerinde durulmakta ve bu üç kriterin kalite kontrol işlemlerinin önemli bir bölümü olduğuna işaret edilmektedir.

BSE Sertifikası

MERCK besiyerleri sadece BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy; Deli Dana hastalığı etmeni) değil, bu gibi diğer tüm olumsuzluklardan arındırılmıştır. MERCK besiyerlerinin bileşimine giren hayvansal peptonlarda ve ekstraktlarda BSE bulunmadığı Avrupa Farmakopisi çerçevesinde belgelendirilmektedir.

Deneyim

MERCK'te deneyim, evrensel kalite anlayışı ve araştırma–geliştirme kavramları her zaman iç içe olmuştur. MERCK 1885 yılında kazein peptonu üretimi için patent almış, 1895 yılında mikrobiyoloji bölümünü kurmuş, 1910 yılında Nutrient Agar ve Nutrient Broth ile ticari üretime geçmiş, 1950 yılında granül besiyerlerini üretmeye başlamıştır.

Yegane Granül Yapı

MERCK dehidre besiyerleri granül yapısındadır. Granül yapıda besiyeri üreten yegane marka MERCK'tir. Bu yapının, kullanıcı açısından hiç bir şekilde ihmal edilemez çok önemli üstünlükleri vardır.

Çalışanların sağlık güvencesi vardır:

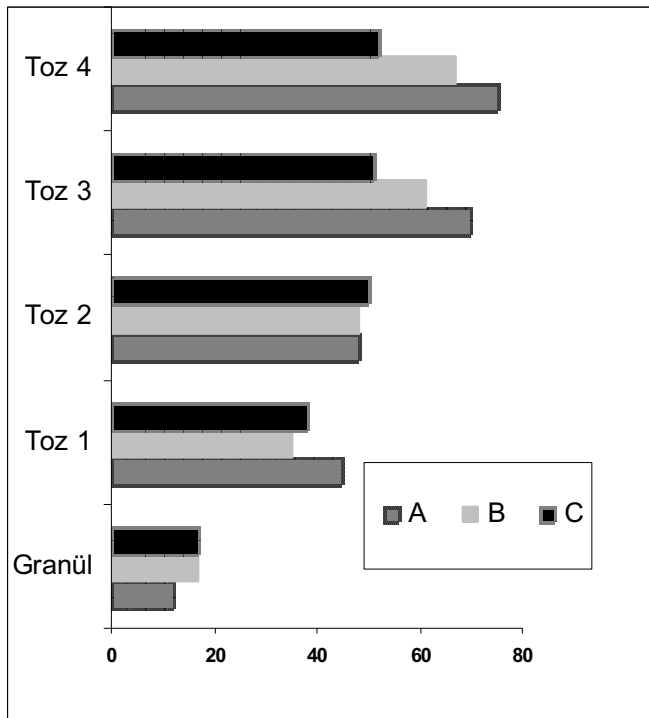
Tartım sırasında toz bulutu oluşumu "toz besiyerleri" ile karşılaştırıldığında yok denecek kadar azdır. Bu durum, deneysel olarak da gösterilmiştir. Böylece tartım sırasında çalışanlar dehidre besiyeri solumamış olur. Bütün markalara ait dehidre besiyerleri içinde insan sağlığına kayda değer ölçüde zararlı olan bileşenler bulunabildiği gibi, en azından aşırı higroskopik (nem çekici) olmasına bağlı olarak besiyerinden çıkan toz bulutu soluma ile ciğerlere zarar verebilir.

Granül yapısında olması nedeni ile MERCK besiyerlerinde kullanıcı zarar görmez. Bir diğer deyiş ile granül besiyeri kullanmak öncelikle kullanıcının sağlığı açısından önemlidir.

Zararlı bileşikler içinde safra tuzları (bile salts), brilliant green, fuchsin, malachite green, selenite, tetrathionate, tergitol, lithium chloride, acriflavine, cycloheximide, sodium azide, thiocyanate, kanamycine, chloramphenicol, rose bengal ve dichloran en sık rastlanılanlar arasındadır. Bunlar, farklı şekillerde ve farklı sürelerde insan sağlığına zarar veren bileşiklerdir. Bu konuda 03.11. Bölümde ayrıntılı bir şekilde bilgi verilmiştir.

Aşağıda farklı markalara ait 4 toz ve 1 granül (MERCK markalı) 3 farklı besiyerinin (A: MacConkey Broth, B: Baird–Parker Agar, C: VRB Agar) tartım sırasındaki toz dağılımı görülmektedir.

Şekil 01. Tartım sırasında havada toz dağılımı



Tartım sırasında oluşan toz bulutu ile bir miktar soluma olur. Kuşkusuz, bu soluma ile oluşan zararların büyük bir bölümü -örneğin bazı alerjik reaksiyonlar- uzun zaman içinde görülür, bir diğer deyişle sağlığa yönelik bazı olumsuz etkiler ileride ortaya çıkar.

Yapılan çalışmalar besiyeri çeşidine bağlı olarak değişmek üzere, tartım sonrasında oluşan tozun granül besiyerinde sadece 10–18 birim iken, diğerlerinde 33–75 birim arasında olduğunu göstermiştir. Ancak asıl fark granül ve toz besiyerleri arasında görülmektedir.

Bu durumda granül yapıdaki besiyerinin aşağıda açıklanan diğer tüm üstünlükleri önemsense bile, sadece laboratuvar personelinin sağlığı açısından önemi açıktır.

Granül yapısı besiyerine daha kolay erime özelliği verir:

Deneyssel olarak da gösterilen bu üstünlük ile, sterilizasyon öncesi besiyerinin tam olarak eritilme kuralı daha kolay olarak sağlanmaktadır. Bu özellik sayesinde suların mikrobiyolojik analizinde kullanılan ReadyCult Coliforms ve ReadyCult Enterococci sistemleri geliştirilmiştir.

Depolamada nem çekme özelliği diğerlerine göre daha azdır:

Tüm dehidre besiyerleri higroskopik karakter gösterir. Özellikle nemli bölgelerde ve/veya laboratuvarlarda granül yapıda olmayan besiyerleri normal raf ömrü içinde bile kullanılamaz hale gelirken, granül besiyeri standart raf ömrünü nemli ortamın her türlü olumsuzluğuna karşı güvenle tamamlar.

Depolama sırasında bileşim değişikliği söz konusu değildir:

Granül olmayan besiyerlerinde zaman içinde bileşenlerin besiyeri kutusu içindeki dağılımı değişir. Bazı bileşenler kutunun daha alt tabakalarına doğru yer değiştirir. Bu hareket tümüyle basit fizik yasaları çerçevesinde gerçekleşir. Diğer bir deyiş ile, zaman içinde besiyeri kutusunun alt ve üst tabakalarında bileşim farkı meydana gelir. Sonuçta bu besiyerlerinde zayıf/aşırı jelleşme, yetersiz/aşırı selektivite gibi sorunlar ile karşılaşılır. Bu gibi bileşim farkı göstermiş olan besiyeri kutularında katmanlar arasında renk farkı açık bir şekilde görülür.

Böyle sorunların analiz sonucuna yansımaları ise sahte (false) negatif ve sahte pozitif değerlendirmelerdir. Granül besiyerlerinde zaman içinde kutunun alt ve üst tabakaları arasında bileşenlerin hareketi, yine basit fiziksel kurallar çerçevesinde mümkün değildir.

Hazırlanıp depolanmış besiyerlerinde stabilite yüksektir:

Yapılan denemeler taze hazırlanmış ve hazırlandıktan sonra 6 ay depolanmış novobiosin katkılı mEC Broth ve mTSB besiyerlerinde *Escherichia coli* O157 serotipinin gelişme performansında ve *E. coli* ile *Citrobacter youngae* suşlarının baskılanmasında kayıp olmadığını açıkça göstermiştir.

Analiz ekonomisi sağlanır:

Granül besiyerinde bazı katkılar bazal besiyeri bileşimine doğrudan ilave edilebilmektedir. *E. coli* O157:H7 analizinde kullanılan m-TSB ve m-EC Broth, *Salmonella* analizinde kullanılan Selenite Medium ile maya-küf analizinde kullanılan DRBC Agar, RBC Agar, DG 18 Agar ve YGC Agar bu tip besiyerlerine örnek olarak verilebilir. Bu besiyerlerinde katkıya bağlı olmaksızın istenildiği kadar hazırlanma özelliği kullanıcılara kayda değer ölçüde ekonomik avantaj sağlamaktadır. Hazırlanmış RBC ve DRBC Agar besiyerlerinin karanlıkta depolanması gerektiği 03.07.04. Bölümde verilmiştir. Toz besiyerlerinde katkı, 500 mL bazal besiyerine ilave edildiği için 40 Petri kutusunun bir defada hazırlanması gerekir. Oysa, granül formdaki aynı besiyerlerinden istenildiği kadar hazırlanabilir. Bu gibi katkıların bazal besiyerine ilave edilebilmesinin, sadece granül yapıdaki MERCK besiyerlerinde olan bir özellik olduğu gözden uzak tutulmamalıdır.

Sonuç

Besiyerlerinin kullanılmasındaki amaç son derece belirgindir. Gıda sanayisinde gerek kontrol kuruluşlarının gerek işletme içindeki laboratuvarın görevi, test edilen mikroorganizmanın varlığı ya da yokluğu ile sayısının doğru bir şekilde belirlenmesidir. Bu analizlerde sahte negatif (aranan mikroorganizma olduğu halde sonucun "yok" olarak alınması) ve sahte pozitif (aranan mikroorganizma olmadığı halde sonucun "var" olarak alınması) yanında, gerçekte olduğundan daha az ya da daha çok sayım sonuçlarının alınması gibi hatalı sonuçların pek çok nedeni vardır. Bunlardan sahte negatif ve olduğundan daha az sayıda mikroorganizma sayım sonucu alınmasında besiyeri kalitesi oldukça önemli bir faktördür.

Satış fiyatı daha düşük olan besiyerleri tercih edilebilir. Ancak bunların kalitesi de düşük ise yanlış sonuç alınma riski yüksektir ve işletmeye bunun maliyetinin çok daha yüksek olacağı açıktır.

Diğer bir deyiş ile besiyeri fiyatının yüksek ya da düşük olması ile maliyetin pahalı ya da ucuz olması birbirine karıştırılmamalıdır.

Küçük şiddetli depremlerde bile ilk yıkılanlar düşük fiyatla yapılmış ve "ucuz" olduğu sanılan binalardır. Aslında bunlar "çok pahalıdır". İnsan sağlığı ve yaşamını ilgilendiren konularda kalite asla ihmal edilemez ve küçümsenemez. Buna göre MERCK besiyerleri -diğer tüm MERCK ürünlerinde olduğu gibi- kalite/fiyat ilişkisi içinde gerçek tanımı ile çok ucuzdur.

02. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı; Genel Kurallar

- Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarına yetkili kişiler dışında hiç kimse giremez.
- Çalışılan materyalin "mikrop" olduğu asla unutulmamalıdır. Tüm laboratuvar personeli bu konuda eğitim görmüş olmalıdır.
- Laboratuvarda hiçbir şey yenilmez, içilmez.
- Laboratuvarda çanta, palto vb. kişisel eşyalar açıkta bırakılmaz.
- Laboratuvardaki hava akımı ekimlerde kontaminasyona neden olur. Bu nedenle özellikle ekim sırasında laboratuvarda hava akımı olmamalıdır.
- Laboratuvarda klima kullanılıyorsa ekimden 15 dakika önce kapatılmalıdır. Klima özellikle 28 °C'da çalışan inkübatörler için gereklidir.
- Laboratuvarda giyilen önlük ve kullanıyor ise bone ve galoş ile hiçbir koşulda laboratuvar dışına çıkılmaz.
- Sabah işe başlamadan ve akşam iş bitiminde tezgahlar dezenfekte edilmelidir. Personel her giriş ve çıkışta ellerini dezenfekte etmelidir.
- Laboratuvar çöp sepetleri içinde otoklavlanabilir poşet bulunmalı, çöpler otoklavlandıktan sonra atılmalıdır.
- Mikroorganizma üremiş materyalin kırılması ya da yere dökülmesi halinde gereken karantina ve dezenfeksiyon uygulanmalıdır.
- Mikrobiyolojik analiz laboratuvarında starter kültür üretimi yapılmaz.
- Laboratuvar buzdolaplarında, çekmecelerde ve diğer laboratuvar alanlarında tüketim amaçlı gıda maddesi bulundurulmaz.
- Laboratuvarda acil durumda kullanılmak üzere yeterli sayıda ve steril olmak üzere boş erlen, boş tüp, boş Petri kutusu gibi cam malzeme ile günlük kullanılan besiyerlerinden depolanabilenler hazır halde ve yedek olarak bulundurulmalı, her 15 günde bir bu malzeme yeniden hazırlanmalıdır.
- Pipetler hiçbir şekilde ağızla çekilmemeli, personel puar, pipetör vb. yardımcı malzeme kullanmalıdır.
- Laboratuvardaki cihazların kalibrasyonu düzenli olarak yapılmalıdır.
- Analiz raporlarında gerekli ise inkübasyon sıcaklığı ve süresi yazılmalıdır.
- Kirli malzemenin nasıl temizleneceği ve atılacağı talimatlarla belirtilmelidir (bakınız; 08. Bölüm).
- Laboratuvarda otokontrol uygulanmalı, belirli aralıklarla analizin doğru yapıldığı denetlenmelidir (bakınız; 09. Bölüm).

-Analiz raporlarının yazımında silinebilir kalem (kurşun kalem vb.) kullanılmaz. Raporlar mutlaka dolma kalem, tükenmez kalem gibi silinemez kalemle yazılmalı, hatalı kayıt asla silinmemeli, üzeri çizilerek doğrusu yazılmalıdır. Elektronik ortamda tutulan kayıtlarda da benzeri uygulama yapılmalıdır. Elektronik ortamda güvenlik yeterince sağlanmalıdır. Laboratuvar kayıtlarının en az 2 yıl boyunca korunması gereklidir.

-26 Haziran 2002 tarih ve 24796 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe girmiş olan "İyi Laboratuvar Uygulamaları Prensipleri ve Test Laboratuvarlarının Belgelendirilmesine Dair Yönetmelik" laboratuvarında bulundurulmalı, personelin bu yönetmeliği okuması sağlanmalıdır.

-ISO 7218 sayılı "TS 7894 ISO 7218; Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi–Mikrobiyolojik Muayeneler için Genel Kurallar" adlı standart Türk Standartları Enstitüsü'nden sağlanmalı, laboratuvar personelinin bu standardı okuması sağlanmalıdır.

Standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı için, 20 m² uygun bir alan olarak nitelendirilir. Daha büyük alana sahip laboratuvarlarda temizlik daha zor yapılmakta, buna bağlı olarak kontaminasyon riski artmaktadır. Laboratuvar doğrudan güneş ışığı almamalı, yeterli aydınlatma ve iyi bir havalandırma sağlanmalı ve sıcaklığın 25 °C'dan fazla olması halinde klima kullanılmalıdır.

Laboratuvar çalışma havasında mikroorganizma yükü olabildiğince az olmalıdır. 15 dakika süre ile kapağı açık bırakılan bir Plate Count Agarda 15 koloni olması kabul edilebilir bir değerdir.

Aşağıda laboratuvarında kullanılan bazı temel aletler ile ekipmana ilişkin kısa bilgiler verilmiştir:

-Soğutucu: Örnekleri 0–4,4 °C'da tutmalı, amaca uygun büyüklükte olmalı, sıcaklık kayıtları düzenli olarak tutulmalıdır.

-Dondurucu: Örnekleri –15 °C ya da daha düşük sıcaklıklarda tutabilmeli, amaca uygun büyüklükte olmalıdır.

-Kuru hava sterilizasyon fırını (etüv): Yeterli büyüklükte olmalı, sterilizasyon sırasında sıcaklığın düzgün dağılımına izin verecek şekilde doldurulmalı, asla aşırı yükleme yapılmamalıdır. Etüvün doğru çalıştığı kontrol edilmelidir.

-İnkübatör ve/veya inkübasyon odası: Petri kutularının aralarında 2,5 cm boşluk olacak ve cam Petri kutularında en çok 6, plastik kutularda ise en çok 8 adedinin üst üste konulacağı şekilde doldurulmaya izin verecek boyutta olmalıdır. İnkübatör maya–küf sayımı için kullanılıyorsa, Petri kutularının inkübatörde 5 gün süre ile kalacağı hesaba katılarak boyut seçilmelidir. İnkübasyonda sıcaklık ve nem kaybı izlenmelidir (bakınız; 06.02. Bölüm).

-Otoklav: İdeal olarak besiyeri ile çözeltileri sterilize etmek ve yıkama öncesi kirli malzemeyi sterilize etmek için 2 ayrı otoklav bulundurulmalıdır. Sterilize edilecek malzeme otoklav iç çeperlerine değmeyecek ve hava akımına izin verecek şekilde doldurulmalıdır. Otoklavın doğru çalıştığı kontrol edilmelidir.

-pH metre: Sadece elektronik ve 0,1 pH birimi aralığında okunabilir olmalı, her gün pH 4,0 ve 7,0 olan çözeltilerle kontrol ve gerekirse kalibrasyon yapılmalı, sapma kayıtları tutulmalıdır. Bu çözeltiler hiçbir şekilde tekrar kullanılmamalıdır. Elektrotların kullanılmaya başlandığı tarih kayda alınmalıdır.

-Terazi: Sadece elektronik modeller ve genel laboratuvar amaçları için en az 0,1 g duyarlılığında olanlar kullanılmalıdır. Teraziler, ayda bir kez balon joje kullanılarak hacmi tam bilinen su ile, yılda bir kez de sertifiye ağırlık ile kontrol edilmelidir. Terazinin yer değiştirmemesine özen gösterilmelidir.

-Su banyoları: Ayarlanan sıcaklıklar termostatik olarak kontrol edilebilmelidir. Su banyoları tercihen su sirkülasyonlu olmalıdır. Bunlar agarlı besiyeri eritmek için kullanılamaz. Mikroişlemcili modeller tercih edilmelidir.

-Mikrodalga fırın: Besiyeri eritmek amacıyla kullanılır. Besiyeri çok kısa bir süre içinde kaynama noktasına gelebilir. Laboratuvar personeli bu konuda uyarılmalı ve çok dikkatli olmaları gerektiği konusunda bilgilendirilmelidir.

-Pipetler: Otomatik pipet kullanıldığında her 3 ayda bir yapılacak kontrollerde, her birinde ayrı uç kullanılmak üzere 10 ardışık ölçümün ağırlıkça ortalaması, belirlenmiş dağıtım hacminin $\pm\%5$ sınırı içinde olmalıdır. Ağzı kırık, çizilmiş ya da diğer hataları olan cam pipetler kullanılmamalıdır.

-Petri kutuları (cam ya da plastik): Kutunun iç çapı en az 80 mm, sayım için 12 mm yükseklik olmalıdır. İşletmeye sadece plastik Petri kutusunun sokulabileceği unutulmamalı ve buna göre acil durumda kullanılmak üzere her zaman bir miktar yedek steril plastik Petri kutusu bulundurulmalıdır.

Dehidre besiyerleri higroskopik (nem çekici) özelliktedir. Dolayısı ile ağzının sıkı bir şekilde kapatılmış olarak kuru yerlerde depolanması gerekir. Besiyeri kutusu ilk açıldığında üzerine açım tarihi yazılmalı ve hiçbir koşulda aynı besiyeri çeşidinden aynı anda birden fazla kutu açılmamalıdır. Bu konuda 03.07.01. Bölümde ayrıntılı bilgi verilmiştir. Besiyeri kutularının açılmasında "ilk giren ilk çıkar" kuralına titizlikle uyulmalı, ilgili kayıtlar düzenli tutulmalıdır.

Mikrobiyoloji laboratuvarında yönetmelik ve talimatlara her zaman uyulmalıdır. Tehlikeli ve hastalık yapıcı test suşları ve bunları bulundurabilecek örnekler ile çalışılan her türlü mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanan tüm işlemlerin şüpheli mikroorganizmaların biyogüvenlik düzeylerine göre yapılmalıdır. Biyogüvenlik açısından 4 düzey vardır:

-Biyogüvenlik Düzeyi 1: Yetişkin insanlarda her zaman hastalık yaptığı bilinmeyen mikroorganizmalar ile çalışmak. Örnek: *Serratia marcescens*.

-Biyogüvenlik Düzeyi 2: İnsan hastalıklarıyla geniş çapta ilişkili, ancak sıçrama veya havaya karışarak solunum yolu ile enfeksiyon yaptığı bilinmeyen mikroorganizmalar ile açık tezgah üzerinde çalışmak. Örnek: *Salmonella* spp.

-Biyogüvenlik Düzeyi 3: Solunumla bulaşma potansiyeli olan ve potansiyel olarak ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu açıkça bilinen mikroorganizmalar ile çalışmak. Bu gibi mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda biyolojik güvenlik kabini kullanılmalıdır. Örnek: *Mycobacterium tuberculosis*.

-Biyogüvenlik Düzeyi 4: Hava ile bulaşabilecek çok tehlikeli ve aşı ya da tedavisi olmayan ajanlarla çalışmak. Özel ekipman ve düzenler gerekir. Örnek: Congo–Criman hemorrhagic fever.

Buna göre "gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı" biyogüvenlik düzeyi "2" olarak ele alınmalı, ancak tehlikenin boyutu asla küçümsenmemelidir. Analiz edilecek gıdada havadan bulaşan bir mikroorganizma bulunmadığı kesin değildir.



International
Organization for
Standardization

ISO 11133

Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi - Kültür Besiyeri Hazırlama ve Üretim Kuralları

Bölüm 1

Laboratuvarda Kültür Besiyeri Hazırlamada Kalite Güvenliği

Bölüm 2

Kültür Besiyerlerinin Performans Testi

03. Besiyerleri *

03.01. Genel Bilgiler	10
03.02. Kısa Tarihçe	10
03.03. Besiyeri Hazırlama Şekilleri	12
03.03.01. Formülden Hazırlama	14
03.03.02. Dehidre Besiyerlerinden Hazırlama	14
03.03.03. Kullanıma Hazır Besiyerleri	15
03.03.04. Özel Uygulamalar	16
03.04. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler	17
03.04.01. Su	18
03.04.02. Peptonlar	19
03.04.03. Maya Ekstraktı	21
03.04.04. Et Ekstraktı	21
03.04.05. Malt Ekstraktı	21
03.04.06. Beyin ve Kalp Ekstraktı	21
03.04.07. Agar	22
03.04.08. Karbohidratlar	23
03.04.09. Tuz	23
03.04.10. Tampon Maddeler	24
03.04.11. pH İndikatörleri	25
03.04.12. Redoks İndikatörleri	26
03.04.13. Diğer İndikatörler	26
03.04.14. İnhibitörler	27
03.04.15. Diğer Maddeler	28
03.05. Besiyeri Çeşitleri	29
03.05.01. Genel Besiyerleri	30
03.05.02. Selektif Besiyerleri	31
03.05.03. Diferansiyel (Ayırt Edici; Fark Ettirici) Besiyerleri	32
03.05.04. Zenginleştirme Besiyerleri	33
03.05.05. İdentifikasyon Besiyerleri	34
03.05.06. Diğerleri	35
03.06. Besiyerlerinin Hazırlanması	35
03.06.01. Cam Malzeme	38
03.06.02. Tartım ve Eritme	38
03.06.03. pH Ayarlama	41
03.06.04. Katkıların İlavesi	42
03.06.05. Petri Kutularına Döküm	44
03.06.06. Kurutma	45
03.06.07. Yeniden Eritme	46
03.07. Depolama	47
03.07.01. Dehidre Besiyerlerinin Depolanması	47
03.07.02. Çözeltilerin Depolanması	48
03.07.03. Katkıların Depolanması	49

* Bu bölüm, Prof. Dr. A. Kadir Halkman tarafından yazılmıştır.

03.07.04. Hazırlanmış Besiyerlerinin Depolanması	49
03.08. Çözeltilerin Hazırlanması	51
03.09. Besiyeri Kalite Kontrolü	53
03.10. Besiyeri Hataları	54
03.11. Tehlikeli Maddeler	55

03.01. Genel Bilgiler

Besiyerleri (besi ortamı, ortam, vasat, kültür ortamı, kültür vasatı, kültür besiyeri) mikroorganizmaların geliştirilmesi için formülize edilmiş ortamlardır. Bunlar, mikroorganizmaların geliştirilmesi, izolasyon, identifikasyon, sayım, duyarlılık testleri, sterilite testleri, klinik örneklerin incelenmesi, gıda, su ve çevre kontrolleri, biyolojik ürünlerin elde edilmesi, antibiyotik ve vitamin analizleri, endüstriyel analizler vb. gibi çok farklı amaçlara yönelik olabilir.

Besiyerleri çok farklı şekillerde hazırlanabilir ve kullanılabilir. Örneğin, süt bir "genel besiyeri" olup, mikroorganizmaların gelişmeleri için gerekli bütün besin maddelerini ve bunların kullanılabilmesi için yeterli suyu içerir. Üzüm suyunda da gelişme için gereken besin maddeleri ve su bulunmasına karşın, yüksek asitliği nedeni ile sadece bu asitlikte gelişebilecek olan mikroorganizmaların (bazı bakteriler ve özellikle mayaların) gelişimine uygundur.

Besiyerleri hakkında TS EN 12322; "Vücut Dışı Kullanılan Tıbbi Tanı Cihazları- Mikrobiyoloji Kültür Besiyerleri- Kültür Besiyerlerinin Performans Kriterleri, Direktif: 93/42/EEC, 98/79/EC" adlı yayın Türk Standartları Enstitüsü'nden sağlanabilir.

03.02. Kısa Tarihçe

Mikrobiyolojinin tarihçesinde kilometre taşı olarak anılan iki gelişme; 1674 yılında Antoni van Leeuwenhoek'un mikroskobu icat etmesi ve bundan yaklaşık 2 yüzyıl sonra 1881 yılında Robert Koch'un jelatin kullanarak elde ettiği katı besiyerinden *Bacillus anthracis* 'i izole etmesidir. Böylece, hastalık etmeni olan pek çok bakteri izole edilebilmiş ve "Hasta bireyden muhtemel hastalık etmenini saf halde izole et. Bu etmeni sağlıklı bireye aşıla. Hastalık semptomlarının aynı olduğunu izle. Hastalandırılmış bireyden saf halde izole edeceğin etmenin, ilk hasta bireyden izole ettiğin ile aynı olduğunu göster." şeklindeki Koch postulatı, giderek sistematik analiz yöntemi haline dönüşmüştür. Louis Pasteur tarafından 1882'de aşılamanın bulunması, 1928'de Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesi de mikrobiyoloji tarihinin önemli kilometre taşları arasındadır. Bu bölümdeki amaç, tüm mikrobiyoloji tarihini vermek değildir ve bu konu, kitabın kapsamı dışında kalır.

Aşağıda besiyerlerinin geliştirilmesi üzerine kısa bir kronoloji verilmiştir.

1817: Bartholomeo Bizio, ekmek üzerindeki kan gibi kırmızı renklenmelerin gerçekte ne olduğunu araştırmış, bunları mikroskop altında incelemiş ve mikroorganizmaları görmüştür. Kırmızı renkli sütlü ekmeği taze sütlü ekmeğe değiştirerek, *Serratia marcescens* olarak adlandırdığı bu mikroorganizmanın gelişmesini sağlamış ve renklenmenin insan eliyle yapıldığını kanıtlamıştır.

1861: Louis Pasteur, mayaların oksijenli ve oksijensiz ortamda gelişimini inceleyip, bunların geliştirilmesi için sıvı besiyeri formülünü açıklayan ilk bilim adamı olarak tarihe geçmiştir.

1869: Ferdinand Cohn, besiyeri bileşiminde mineral maddelerin önemini göstermiştir. Böylece farklı grup mikroorganizmalar ile çalışma olanağı doğmuştur.

1872: Alman botanikçi Oscar Brefeld, sıvı besiyerine jelatin ekleyerek elde ettiği katı besiyerinde tek spordan küf kolonilerini ürettiğini bildirmiştir.

1873: Edwin Klebs, "fraksiyon yöntemi" olarak adlandırdığı bir seyreltme tekniği kullanarak ayrı kültürler elde eden ilk bakteriyologlardan biridir. Bu yöntem basit olarak, sıvı ortamdan az miktarda örneğin başka bir besiyerine inokülasyonudur. Bu yöntemin dezavantajları karışık kültürlerden sadece baskın türün izole edilebilmesi ile çok fazla işgücü ve malzeme gerektirmesidir.

1877: John Tyndall, bugün Tindelizasyon olarak anılan ardışık ısıtma işlemi ile sterilizasyonu açıklamıştır.

1878: İlk saf kültür, "seyreltme tekniği" ile Joseph Lister tarafından elde edilmiştir. Lister, Pasteur'ün laktik fermentinden, sütte ekşimeye yol açan *Bacterium lactis* adını verdiği bakteriyi izole etmiştir. Bir öze ucu dolusu kesilmiş sütü steril kaynamış suya aktarmış, gerekli seyreltmeyi mikroskop kullanarak belirlemiş ve tek bakterinin olduğu seyreltiyi inokülasyon amacıyla kullanmıştır.

1880: İsviçreli bir botanikçi olan Karl Wilhelm von Nägeli, besiyeri hazırlamada pepton kullanımını öneren ilk bilim adamıdır.

1881: Robert Koch, aseptik olarak kesilmiş patates dilimlerinin, katı besiyeri olarak kullanımındaki yetersizliği üzerine, %10 jelatin eklenmiş sıvı besiyeri kullanarak *Bacillus anthracis* 'in saf kültürünü elde etmiştir.

1882: Koch'un çalışma arkadaşları olan Walter Hesse ile eşi Fanny Eilshemius Hesse tarafından katılaştırıcı olarak agar önerilmesi ile birlikte sıvı besiyerinin katılaştırılmasında yeni bir dönem başlamıştır.

1883: Gayon ve Gabriel Dupetit, şekerler ve alkoller gibi basit organik bileşiklerin kompleks organiklerin yerini alabileceğini göstermişlerdir.

1889: Limbourg, inhibitör olarak safra tuzları kullanmıştır. Saffra tuzları (Ox Bile) günümüzde de koliform bakteriler için olan besiyerlerinin çoğunda bulunmaktadır.

1891: Coprrado, safranın *B. mallei* gelişmesini teşvik ederken, *B. anthracis* için bakterisit olduğunu ve *B. typhosus* ile *B. pneumoniae* üzerinde etkisi olmadığını gözlemiştir. Bu şekilde inhibitör kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır.

1900: MacConkey ve Hill, Safra Tuzu Glikoz Brothu fekal kontaminasyon için basit bir test olarak önermişlerdir. Hemen arkasından MacConkey bu besiyerinde *B. enteritidis* 'i geliştirmek için glikoz yerine laktoz kullanmıştır.

1902: Wilhelm von Drigalski ve Heinrich Conradi, *Salmonella typhi* ile *E. coli* 'yi ayırt etmek için bu iki bakterinin şeker metabolizmasındaki farkını kullanmayı önermişlerdir. Böylece, selektif izolasyon kavramı daha da belirginleşmiştir.

1908: Christiaan Eijkman, sıcak kanlı hayvanların bağırsağından izole edilmiş koliform bakterilerin Glikoz Broth besiyerinde, 46 °C'da inkübe edildiğinde gaz ürettiğini göstermiştir. Bu test günümüzde de benzer bir şekilde kullanılmaktadır.

1908: Prof. R. Doerr, laboratuvarlar için Petri kutusuna Nutrient Agar dökerek hazırlanan besiyeri önermiştir.

1909: Prof. E.L. Marx, laboratuvar ölçeğinde dehidre Nutrient Broth, Nutrient Agar ve Endo Agar formüllerine öncülük etmiştir.

1910: Amerikan Bakteriyologlar Derneği toplantısında W.D. Frost tarafından hazır besiyeri için benzer bir proses açıklanmıştır.

1910: İlk ticari besiyeri üretimi Nutrient Agar ve Nutrient Broth ile başlamıştır.

1916: Holt-Harris ve Teague, patojenik enterobakteri tanımlama ve izolasyonu için kullanılmak üzere Eosin Methylene Blue Lactose Sucrose (EMB) Agar besiyerini geliştirmişlerdir. EMB Agar, günümüzde de kullanılan bir besiyeridir.

1950: Granül besiyeri üretimine başlandı.

03.03. Besiyeri Hazırlama Şekilleri

Standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı tipik bir ev mutfağına benzer. Besiyeri hazırlamak ise, evde yemek yapmaktan çok farklı değildir. Mikrobiyolojik amaçla kullanılacak bir besiyerinin hazırlanması çok basit olarak mutfakta çorba yapmaya benzetilebilir. Örneğin, domates çorbası yapmak için yemek kitaplarında miktarları verilerek tarif edildiği şekli ile; önce un yağda kavrulur, üzerine domates suyu, süt ve tuz ilave edilir, pişirilerek "çorba" hazırlanır. Ya da daha basit olarak, hazır toz haldeki domates çorbası belirli miktarda su ile pişirilir.

Benzer şekilde, besiyeri bileşimine giren maddeler ayrı ayrı tartılarak, ya da hazır dehidre besiyeri doğrudan tartılarak su içinde çözülür. En basit olarak; Nutrient Broth'un bileşimi litrede 5 gram pepton ve 3 gram et ekstraktı şeklindedir.

Laboratuvarıda pepton ve et ekstraktı varsa, bunlar doğrudan tartılıp, 1 litre damıtık su içinde çözülür ve gerekli büyüklükteki cam kaplara dağıtılarak sterilize edilir. Laboratuvarıda hazır dehidre Nutrient Broth varsa, bundan 8 gram tartılarak, 1 litre damıtık su içinde çözülür ve yukarıdaki işleme devam edilir.

Nutrient Broth gibi basit bir besiyerine giren maddeler, çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında her zaman "el altında" bulunur. Dolayısı ile, Nutrient Broth'u bileşimden hazırlamak genellikle sorun değildir.

Ancak, yabani maya izolasyonu ve sayımında kullanılan Lysine Medium besiyerinde 25 madde olduğu, bunlar arasında 0,000001 g/L folik asit gibi tartımın da bulunduğu dikkate alındığında, bu tip besiyerlerini standart bir mikrobiyoloji laboratuvarında bileşimden hazırlamanın kolay ve günlük uygulamada hiçbir şekilde pratik olmadığı ortaya çıkar.

Alicyclobacillus spp. aranmasında kullanılan BAT Agar ile özellikle *Listeria monocytogenes* aranmasında kullanılan ALOA Agar besiyerlerinin de standart bir laboratuvarıda bileşimden hazırlanması oldukça güçtür.

Kuşkusuz, bileşimine 2 madde giren Nutrient Broth ile bileşimine 25 madde giren Lysine Medium besiyerleri uç noktalarda örneklendirilen besiyerleridir.

Besiyerinin bileşimi ister basit, ister kompleks olsun, bileşimden hazırlamak yerine dehidre hazır besiyeri kullanmanın 3 önemli üstünlüğü vardır:

- Her maddeyi ayrı ayrı tartmak yerine hazır besiyerinden 1 kez tartım yapmak çok daha kolay ve güvenilir bir uygulamadır.

- Özellikle miligram düzeyinde tartım yapılacak besiyeri bileşenlerinde hata yapma olasılığı vardır. Oysa bu maddeler hazır dehidre besiyerleri içinde homojen dağıtıldıklarından tartımlar çok daha güvenilir olur.

- Hazır besiyeri kullanmanın en önemli üstünlüğü -hatta bir diğer deyiş ile zorunluluğu- bileşenlerin performansı ile ilgilidir. Ayrı ayrı tartılan bileşenlerden birisinin dahi özelliğini yitirmiş olması, o madde ile hazırlanan besiyerinin performansında kayda değer ölçüde kayba, hatta o besiyerinin tümüyle kullanılamaz hale gelmesine yol açar.

Besiyerlerinin bileşimine çok genel bir ortalama olarak 5–7 madde girer. Laboratuvarıda bulunabilen bu bileşenlerin tümünün yeterli performans göstermesi beklenmemelidir. Özellikle organik bileşenlerin depolanma ömürleri anorganik maddelere göre çok daha kısadır. Buna göre bileşenlerin bir ya da bir kısmının performansında kayda değer düşme olmuş ise, bu düşüş doğrudan besiyeri performansına yansımacaktır.

03.03.01. Formülden Hazırlama

Yukarıda çeşitli örnekleri verildiği gibi besiyeri bileşenlerinin ayrı ayrı tartılarak besiyerinin hazırlanma şeklidir. Genel olarak önerilen bir yöntem olmamakla birlikte, aşağıda verilen 2 koşulda besiyerinin bileşim üzerinden hazırlanması bir anlamda zorunludur:

-Her besiyerinin ticari olarak pazarlanan dehidre hazır besiyeri formu yoktur. Özellikle yeni geliştirilen besiyerleri -güvenilirliklerini kanıtlayana ve/veya yeterli pazarlama potansiyeline ulaşınca kadar- besiyeri üreticisi firmalar tarafından dehidre halde hazırlanmamaktadır.

-Özellikle çeşitli bilimsel araştırmalarda yeni ve modifiye besiyeri çalışmaları için bileşenlerin ayrı ayrı kullanılması gerekmektedir.

Besiyerinin bileşimden hazırlanması gerektiğinde, bazen bileşime giren malzemelerin tümü formülde verildiği şekli ile laboratuvarında bulunmaz.

Örneğin, laktik asit bakterileri için kullanılan MRS Agar besiyerinin formülünde $MgSO_4$ 0,2 g/L olarak verilmektedir. Laboratuvarın kimyasal madde deposunda $MgSO_4$ yok, ama bunun yerine $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ varsa molekül ağırlığı üzerinden hesaplanarak kullanılabilir.

$MgSO_4$ 'ın molekül ağırlığı Mg: 24; S: 32; O: 16 (4 atom oksijen olduğuna göre $4 \times 16 = 64$) olmak üzere 120 mol gramdır. $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ 'da ise, ilave 6 su olduğuna göre molekül ağırlığı $120 + 108 = 228$ mol gram olarak hesaplanır.

İkinci aşamada basit orantı kurulur:

Mol ağırlığı 120 olan maddeden	0,20 gram gerekiyorsa
Mol ağırlığı 228 olan maddeden	0,38 gram gerekir.

Buna göre, 0,2 g/L $MgSO_4$ yerine 0,38 g/L $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ kullanılması aynı anlama gelmektedir. Aradaki fark $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ 'da bulunan sudan kaynaklanmaktadır.

03.03.02. Dehidre Besiyerlerinden Hazırlama

Besiyeri üreticisi firmalar tarafından üretilmiş dehidre besiyerleri kullanımının tartışılmaz bir üstünlüğü vardır.

Burada dikkat edilmesi gereken konu kalitedir. Pazarda düşük fiyatla satılan, bu nedenle cazip gösterilen, ancak kayda değer düzeyde performans eksikliği olan markaların bulunduğu da dikkate alınmalıdır.

03.03.03. Kullanıma Hazır Besiyerleri

1950'li yıllardan bu yana, bazı besiyeri üreticisi firmalar tarafından kullanıma hazır halde besiyerleri üretilmekte ve pazarlanmaktadır. Bunlar, vida kapaklı tüp ve şişelerde sıvı ve katı besiyerleri ile oldukça yaygın olarak Petri kutularında agarlı besiyerleridir. Genellikle, plastik Petri kutularında hazırlanan agarlı besiyerleri sadece tek çeşit besiyerini içerebileceği gibi, iki ya da üçe bölünmüş kutularda farklı besiyerleri de bulunabilmektedir. Bunlar içinde en yaygın kullanılanlardan biri Kanlı (Blood) Agardır. Bu besiyerinin neden hazır halde sağlanması gerektiği ve bu uygulamanın neden daha ucuz olduğu 10. Bölümde anlatılmıştır.

Yüzey kontaminasyonlarının belirlenmesi ve/veya kültürlerin taşınmasında kullanılan hazır agar slaytları da bulunmaktadır. Bu hazır besiyerlerinin 2 farklı yüzünde 2 farklı besiyeri bulunan tipleri aynı örnekte hem toplam bakteri hem de koliform grup bakteri analizine olanak sağlamaktadır. Bunların bir yüzü maya-küf, diğer yüzü toplam bakteri vb. çeşitleri de vardır. Bu tip besiyerlerini kullanmak işletme laboratuvarında büyük kolaylık sağlamaktadır.

Mikrobiyolojide, başta sayım ve var/yok testlerinde kullanılmak üzere çeşitli amaçlarla membran filtreler kullanılmaktadır. Örneğin, içme ve kullanma sularında *E. coli* aranması ya da sayılması için en yaygın uygulamalardan biri, su örneğinin membran filtreden geçirilip, bu filtrenin uygun bir katı besiyerine yerleştirilerek inkübasyona bırakılmasıdır. Burada, amaca uygun bir şekilde hazırlanmış ve Petri kutusuna dökülmüş bir katı besiyeri kullanılabilmesi gibi, bu amaçla hazırlanmış özel besiyerleri de kullanılabilir. Bu tip besiyerleri uygun bir pede emdirilmiş, kurutulmuş ve plastik bir kutu içine konularak sterilize edilmiş bir şekilde pazarlanmaktadır. Kullanıcı için yapılacak tek işlem pedi steril su ile ıslatmak ve filtreyi bu pede yerleştirerek inkübasyona bırakmaktır.

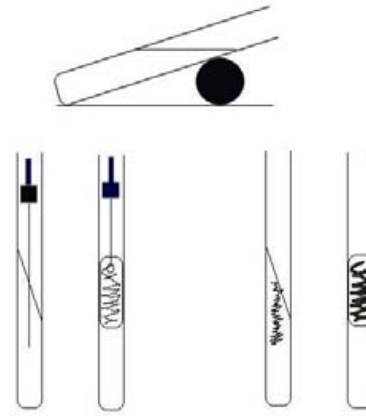
Kullanıma hazır besiyerleri içinde bir diğer yaklaşım gama radyasyonu ile sterilize edilmiş dehidre besiyerleridir. Bunlardan ışınlanmış Tryptic Soy Broth, genellikle serum gibi steril olması gereken tıbbi malzemede sterilite testi yapmak için kullanılır. Serum içine steril koşullarda ilave edilen besiyeri kolaylıkla erir ve inkübasyon sonunda bulanıklık olursa serumun steril olmadığı anlaşılır. Bu testin mantığı, steril dehidre besiyerini, steril kap içinde, steril olması gereken sıvı ile çözerek bir çeşit besiyeri hazırlamaktır. Membran filtrasyon sisteminde bazı sporlar ile *Hydrogenophaga pseudoflava* (Syn. *Pseudomonas pseudoflava*) gibi küçük bakteriler ve *Acholeplasma laidlawii* gibi mikoplazmalar 0,1µ porlu membran filtrelerden geçebilir ve bu nedenle membran filtre tekniği ile bu gibi bakterilerin varlığı fark edilemez. Işınlanmış Tryptic Soy Broth yönteminde ise böyle bir olumsuzluk yoktur. Aynı yaklaşım ile, sularda koliform grup bakteri ve *E. coli* ile enterokok analizinde kullanılan ReadyCult sistemi sırası ile 12.03. ve 22.01. Bölümlerde verilmiştir.

03.03.04. Özel Uygulamalar

Standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında kullanılan besiyerlerinin tamamına yakını tüpte ya da erleninde (balon, dilüsyon şişesi, vb.) broth formunda ve Petri kutularında agar formunda hazırlanır. Bunlara ilaveten, aşağıda verilen kullanım amaçlarına yönelik olarak özel hazırlama şekilleri de bulunmaktadır.

Tüpte yatık agar: Tanımlama, kültür koleksiyonu vb. pek çok amaçlarla kullanılan agarlı besiyeridir. Amaç, tüpte geniş bir yüzey elde etmektir. Standart deney tüplerine 7 mL olacak şekilde tam olarak eritilmiş agarlı besiyeri dağıtılır ve otoklavlanır. Otoklav sonrasında besiyeri henüz sıvı iken tüpler bir çubuk üzerine yatırılarak katılaşması sağlanır. Bu aşamada dikkat edilmesi gereken husus, tüplerin dip kısımlarının yaklaşık 2,5 cm derinliğinde olmasıdır. *Salmonella* spp. analizinde kullanılan Triple Sugar Iron Agar en tipik örnektir.

Şekil 02. Yatık Agar Hazırlanması



Çift kuvvetli broth: EMS ile yapılan sayımda (bakınız; 07.02.01. Bölüm) 10 mL besiyerine 10 mL örnek aktarıldığında, besiyerinin konsantrasyonu yarı yarıya azalır ve burada sağlıklı bir mikrobiyel gelişme olmaz. Bunun önüne geçmek için, 10 mL gıda örneği (homojenizat) ilave edilecek tüplerde, başlangıçta bu besiyerleri çift kuvvette (2 misli konsantrasyonda) hazırlanır. Örneğin, koliform grup bakteri analizinde kullanılan LST Broth besiyeri normal olarak 35,5 g/L konsantrasyonda hazırlandığında, 10 mL tüp içinde 0,355 g madde vardır. Çift kuvvetle hazırlanması gerektiğinde, başlangıçta 71 g/L (0,71 g/10 mL) olarak hazırlanır, bunun üzerine 10 mL örnek konulduğunda LST konsantrasyonu 0,71 g/10 mL'den 0,355 g/10 mL standart değere iner. Bu tip ekimler için yeteri büyüklükte tüp kullanılmalıdır.

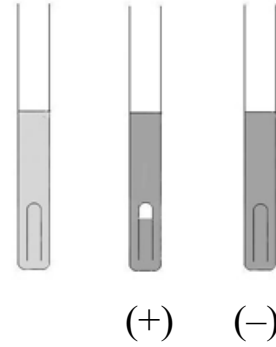
Roux Şişesi: Genel olarak, çok miktarda mikroorganizma kültürü elde etmek amacı ile kullanılır. Yüzey alanı 250 cm² kadardır. Buna göre 100 mL kadar agarlı besiyeri ile birlikte sterilize edilir. Otoklav sonrasında düzgün bir yere yatırılarak agarın donması sağlanır. Geniş ağzından sürtme (svap) çubuğu yardımı ile yoğun bir inokülasyon yapılabilir. İnkübasyon sonrası yıkama ile kültür elde edilir. Bu işlem, hasat (harvesting) olarak da adlandırılır.

Şekil 03. Roux Şişesi



Durham tüpü olan besiyerleri: Koliform grup bakterilerin analizinde laktozdan gaz oluşumu tipik bir reaksiyondur. Besiyerinde gaz çıkışı, standart tüpün içine ters olarak yerleştirilen ve Durham tüpü olarak adlandırılan küçük tüplerde gaz birikimiyle anlaşılır. Besiyeri hazırlanırken, standart tüpün içine önce Durham tüpünün atılması, üzerine besiyeri ilavesi ile sterilizasyon öncesinde daha az hava kalması sağlanır. Standart otoklavlamada tüpte kalan hava çıkar.

Şekil 04. Durham Tüpü



Çift Kat Ekim: Koliform grup bakteri ekiminde yaygın olarak uygulanır. Yayma ya da dökme yöntemiyle standart ekimde; dökme yönteminde besiyerinin tam jelleşmesinden sonra, yayma yönteminde ise besiyerinin yayılan kültürü tam emmesi için 10 dakika beklendikten sonra üzerine 4–5 mL kadar ikinci kat besiyeri dökülür. Bu uygulamada genellikle aynı besiyeri kullanılmakla beraber, özel çalışmalar amacıyla farklı bir besiyeri de kullanılabilir. Temel amaç, kısmi bir mikraerofil ortam yaratmaktır. Bu amaçla toplam bakteri sayımında da çift kat ekim yapılabilir. Başta basiller olmak üzere aerobik bakteriler bu ortamda yine gelişir, ancak yayılcı koloni oluşturamazlar. Eğer toplam bakteri analizinde çift kat ekim yapıldı ise analiz raporunda bu durum belirtilmelidir.

03.04. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler

Besiyerleri hazırlanırken amaç, hedef organizmanın gelişmesini optimize edecek konsantrasyonlarda gerekli besin maddelerinin dengelenmiş karışımını sağlamaktır. Bütün besin öğelerini oldukça fazla miktarda sağlayarak, olabildiğince zengin bir besiyeri yapma yaklaşımı ile optimal besiyeri elde edilemez.

Örneğin, aminoasitlerin dengelenmemesi ve bir amino asidin fazla olması, ilişkili bir amino asidin gelişme için kullanımını baskılayabilir. Glikoz dahil olmak üzere tüm besin öğeleri, konsantrasyonları arttıkça baskılayıcı etki yaparlar.

Besiyeri bileşimine giren maddeler gelişme açısından; a) Gelişme için gerekli olanlar, b) İnhibitörler, c) Diğerleri olmak üzere 3 gruba ayrılabilir. Gelişme için gerekli olan maddeler doğrudan mikroorganizmaların beslenme şekilleri ile ilgilidir ve besiyeri içinde bir anlamda zorunlu olarak bulunur.

İnhibitörler ise gelişmesi istenmeyen mikroorganizmalar için gerektiğinde selektif besiyerlerine ilave edilir. Bunların dışında yine gerektiğinde indikatörler, jelleştiriciler vb. pek çok madde de besiyeri bileşimine girer.

03.04.01. Su

Besiyeri hazırlamada kullanılan suyun damıtma veya deiyonizasyon ile taze hazırlanmış olması, başta bakır olmak üzere toksik metalleri içermemesi gerekir. İyon değiştirici reçineden geçirilerek elde edilen deiyonize (demineralize) su kullanıldığında bunun içinde yüksek sayıda mikroorganizma bulunabileceği dikkate alınmalıdır. Damıtık (distile) su için en ideali, cam sistemlerden elde edilen suyun kullanılmasıdır.

Gerek deiyonize gerek damıtık su elde edilmesinde saf su sisteminin ve benzer şekilde saf suyun depolandığı kapların belirli aralıklarla temizlenmesi gerekir. Bu kaplarda zamanla alg gelişimi olabilir ve alg metabolitleri bazı duyarlı mikroorganizmaların gelişimini baskılayabilir.

Taze hazırlanmış saf suyun pH'sı 6,5–7,5 arasında olmalıdır. Depolanmış saf su atmosferik karbondioksitin absorbe edilmesi sonucu asit pH gösterir. Eğer saf suyun pH'sı 5,5'in altında ise, bu su ısıtılarak CO₂ uzaklaştırılır ve pH yeniden kontrol edilir. Eğer pH hala düşük ise, NaOH ile nötral pH'ya getirilir ve saf su sistemi kontrol edilir. Besiyeri hazırlamada kullanılan su asidik özellik gösteriyorsa ve besiyeri bileşimde bikarbonat tamponlar varsa, bunları etkileyerek hazırlanan besiyerinde bir takım olumsuzluklara yol açabilir.

Özellikle klinik ve veteriner mikrobiyolojiyi ilgilendiren bazı bakteriler, besiyeri hazırlamada kullanılan suyun içindeki safsızlıklara karşı çok duyarlıdır. Bu gibi bakterilerle çalışıldığında suyun çok özenle hazırlanması gerekir. Tersine olarak, gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren ve günlük (rutin) olarak analizleri yapılan mikroorganizmalar bu tip maddelere genellikle duyarlı değildir. Dolayısıyla bu analizler için, doğal kaynak suları besiyeri hazırlanması amacıyla kullanılabilir.

Suyun çok kireçli olduğu bölgelerde damıtık su elde edilmesi bazen sorun olmaktadır. Bu gibi yerlerde besiyeri hazırlamada doğal kaynak sularının kullanılması mümkündür. Ancak, doğal kaynak suları bu amaçla kullanılıyor ise belirli aralıklarla (örneğin üç ayda bir) kullanılan suyun -ya da bu su kullanılarak hazırlanmış besiyeri örneklerinin- bir dış laboratuvara gönderilerek standart şekilde hazırlanmış besiyerine karşı performans denemesi yapılmalıdır. Bu deneme basit olarak, aynı gıda örneğinden iki farklı besiyerine ekim ve sayım sonuçlarının karşılaştırılması şeklindedir. Akü suyu, ütü suyu gibi adlarla satılan suların kaynağı ve elde ediliş şekli bilinmedikçe kullanılmalarından olabildiğince kaçınılmalıdır.

Kaynağı ne olursa olsun, besiyeri hazırlamada kullanılan suyun besin maddelerini ya da inhibe edici maddeleri içermemesi, en az 300.000 Wcm direnç ve en fazla 10 mS (microSiemens) kondüktivite (iletkenlik) göstermesi, 25 °C'da rezistans 0,5 megohm/cm ya da kondüktans 2,0 umhos/cm'den daha az olması gerekir.

Burada değinilen fiziksel değerler farklı kaynaklardan elde edilmiştir. Buna göre, kullanılacak su, bu kriterlerden en az birisini sağlamalıdır. Birden fazla kriter test edildiğinde bunlardan birini sağlıyor, ancak diğer(ler)ini sağlamıyorsa bunun nedeni araştırılmalıdır.

Besiyeri hazırlamada kullanılan suda ayda bir olarak yapılacak ölçümlerde toplam bakteri sayısı 1.000 kob/mL'den, eğer su depolanmış ise 10.000 kob/mL'den az olmalıdır. Benzer şekilde toplam klor kalıntısı negatif ya da kullanılan testin belirleme sınırından daha az olmalıdır. Yılda bir kere toplam metaller (Pb, Cd, Cr, Cu, Ni ve Zn) için yapılan analizde, her bir metal 0,05 mg/L'yi ve metaller toplamı 0,1 mg/L'yi geçmemelidir. Bu kriterler sağlanamıyor ise, düzeltici ve tekrarını önleyici faaliyet (eylem) yapılmalı ve kayda geçilmelidir.

03.04.02. Peptonlar

Pepton terimi, proteinlerin hidrolizi ile elde edilen ürünlere verilen genel isimdir. Bu terim ilk kez R. Koch'un çalışma arkadaşlarından Nägeli tarafından 1880 yılında kullanılmıştır. Nägeli, kemoorganotrof mikroorganizmaların kısmen parçalanmış (hazmedilmiş, sindirilmiş) protein içeren besiyerinde iyi geliştiklerini açıklayan ilk bilim adamıdır.

Yaşayan tüm hücrelerde olduğu gibi mikroorganizmalar da azot, karbon, tuzlar ve diğer besin maddelerine gereksinim duyarlar. İstisnalar dışında, mikroorganizma gruplarının oldukça büyük bir bölümü, proteinleri azot kaynağı olarak kolaylıkla kullanamaz. Bu nedenle azotlu bileşikleri, çok daha kolay kullanabildikleri protein hidrolizatlarından sağlar.

Peptonlar sadece azot değil, karbon kaynağı olarak da mikroorganizmalar tarafından kullanılır. Bunun yanında, peptonların bileşiminde bulunan bazı aminoasitler ve vitaminler de bazı mikroorganizmalar için gelişme faktörü olarak oldukça önemli işlev görür.

Proteinler; kuvvetli asitler ve kuvvetli alkaliler ile ya da enzimatik olarak temel bileşenleri olan peptit ve aminoasitlere ayrışır. Bu amaçla en çok kullanılan proteolitik enzimler papain, pepsin ve pankreatindir.

Peptonlar, birçok ticari firma tarafından çeşitli hayvansal dokulardan, sütten ve soyadan farklı yöntemlerle elde edilir ve farklı ticari isimlerle pazarlanır ve/veya dehidre besiyerleri içine katılır.

Ham madde ve üretim yöntemi farklılığı doğal olarak peptonların bileşimlerinde de farklılıklar oluşturur. Dolayısı ile değişik amaçlar için farklı peptonlar kullanılır.

Proteinler, aminoasit zincirlerinden oluşmuş makro moleküllerdir. Aminoasitler birbirlerine peptit bağları ile bağlanırken 1 molekül su açığa çıkar. Peptit bağlarının kuvvetli asitler kullanılarak, yüksek basınç ve yüksek sıcaklık altında tam olarak kırılması, böylece proteinin tümüyle kendisini oluşturan aminoasitlere dönüştürülmesi mümkün değildir. Bu işlem sırasında bazı aminoasitler (örneğin triptofan) tümüyle kaybolur, sistin, serin ve treonin zarar görürken, asparagin ve glutamin etkilenmez. Benzer şekilde, pepton bünyesindeki vitaminler ciddi ölçüde zarar görür. Bu işlem sırasında karbohidratlar ile aminoasitler arasında meydana gelen bir seri reaksiyon sonunda oluşan bazı kimyasallar, mikroorganizma gelişimi için toksik olur. Bu nedenle, kuvvetli asitler ile peptonların elde edilmesinde peptit bağlarının tümünden değil, mikroorganizma için yeterli azot kaynağı sağlayacak düzeyde -sadece bir kısmının- kırılması hedef alınır.

Proteinlerin enzimatik olarak parçalanması -asit hidrolizine göre- pepton bileşimine daha az zarar verir. Kullanılan enzimler peptit bağlarına özel olup, sadece bu bağlarda parçalanmaya neden olur. Dolayısıyla, elde edilen peptonda kullanılan enzimin çeşidine göre protein parçalanma ürünü olan polipeptitler bulunur. Teorik olarak farklı enzimler kullanılarak, proteini oluşturan tüm aminoasitlere kadar parçalanma mümkün ise de bunun pratik bir önemi yoktur ve besiyeri bileşiminde kullanılacak proteinler sadece -amaca uygun şekilde- belirli düzeyde parçalanarak peptonlar elde edilir.

Günümüzde ticari olarak üretilen ve pazarlanan peptonların hemen hemen tümü enzimatik olarak elde edilmektedir. Sadece kazein, asidik reaksiyon ile hidrolize edilir. Bazik olarak elde edilen peptonun ticari üretimi yoktur. Son zamanlarda BSE tehlikesine karşı bazı ticari firmalar hayvansal dokulardan elde edilen peptonların BSE içermediğine ilişkin sertifika vermektedir.

Mikrobiyolojinin değişik alanlarında farklı peptonlar kullanılır. Besiyerlerinin bileşiminde farklı peptonlar kullanılabilirken, aşı üretimi için bitki kökenli peptonlar uygun değildir. Buna karşın, bitkisel peptonlar enzim üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Besiyeri formülünden hazırlanmak zorunda ise, formülde verilen peptonun kullanılması gereklidir.

Peptonlar mikrobiyolojide tek başlarına besiyeri olarak kullanılabilen ender maddeler arasındadır. Pek çok bakteri, bileşimi sadece %1 pepton olan besiyerinde kolaylıkla geliştirilebilir.

Aksine bir belirtme yoksa, mikrobiyolojide "pepton" denildiğinde, pankreatin enzimi ile hidrolize edilmiş et peptonu (Peptone from meat, pancreatic) anlaşılır. Bu pepton ticari firmalar tarafından farklı isimlerle anılır.

03.04.03. Maya Ekstraktı

Maya ekstraktı (maya özütü, yeast extract), proteolitik olarak otolize edilmiş (parçalanmış) bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Özellikle, yüksek B kompleks vitamini konsantrasyonu sayesinde çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar.

Bileşimindeki aminoasitler, peptitler, vitaminler, karbohidratlar ve mineraller nedeniyle pek çok mikrobiyolojik çalışmada besiyeri katkısı olarak kullanılır. Karbohidrat içermesi nedeniyle karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılmaz.

Maya ekstraktı üretiminde otoliz düzeyi sürekli olarak kontrol edilir ve otolitik aktivite ısıtma ile durdurulur. Böylelikle B kompleks vitaminleri korunmuş olur.

03.04.04. Et Ekstraktı

Et ekstraktı (et özütü, meat extract), genellikle yağı ve tendonları ayrılmış, ekstraksiyon öncesi hafifçe hidrolize edilmiş etten elde edilir. Karbohidrat içermez. Bu nedenle karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılabilir. Çeşitli besiyerlerinde et peptonlarının yerini alabilir.

03.04.05. Malt Ekstraktı

Malt ekstraktı (malt özütü, malt extract), biralık arpanın çimlendirilmesi ve kavrulması ile elde edilen malttan üretilir. Başta maltoz olmak üzere, çeşitli karbohidratların yüksek konsantrasyonuna bağlı olarak maya ve küflerin geliştirilmesi için kullanılır. %1,7 konsantrasyondaki çözeltisi maya ve küflerin geliştirilmesi için uygun bir besiyeridir. Gerekirse bu çözelti çeşitli peptonlar ile desteklenebilir ve/veya asitlendirilebilir ve/veya agar ve pepton eklenerek Malt Extract Agar şeklinde katı besiyeri olarak kullanılabilir.

03.04.06. Beyin ve Kalp Ekstraktı

Beyin ekstraktı (brain extract) ve kalp ekstraktı (heart extract) streptokoklar, pneumokoklar, meningokoklar, gonokoklar vb. gibi zor gelişen (fastidious) patojen bakterilerin geliştirilmesi için Brain Heart Broth ve Brain Heart Infusion gibi isimlerle anılan besiyerlerinin bileşimine katılır. Ayrıca, çeşitli toksin testleri için patojenlerin bu besiyerinde geliştirilmesi önerilmektedir.

03.04.07. Agar

Besiyerlerinin katı hale getirilmesi için en çok kullanılan jelleştiricidir. Çoğu kez diğer agarlı besiyerleri ile karıştırılmaması için "agar agar" olarak anılır. Agar bir poligalaktozid olup, "Agarophytes" olarak adlandırılan bazı kırmızı deniz yosunlarından (*Gelidium*, *Eucheuma*, *Gracilaria*, *Acanthopeltis*, *Ahnfeltia*, *Pterocladia* türleri) elde edilir. Bazı hidroksil grupları sülfürik asit ile esterleştirilmiştir. Mikrobiyolojik kullanım amacıyla en iyi kalitedeki agar *Gelidium* türünden elde edilir. Gıda sanayisinde de jelleştirici olarak kullanılan agar, yeteri kadar saf olmadığı için mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

Agarın katılaştırma (jelleştirme) özelliğini bileşimindeki D-galakton sağlar. Bileşiminde ayrıca inorganik tuzlar, çok az miktarda protein benzeri maddeler ve eser miktarda yağ vardır. Mikrobiyolojide kullanılan agarlar özel olarak saflaştırılarak antimikrobiyel maddeler ve pigmentlerden arındırılır. Bileşiminde bulunan agaroz ve agaropektin adlı iki polisakkarit, agarın etkisini belirler. Agaroz, agarın yüksek jelleştirme özelliğinden sorumlu iken, agaropektin viskoz özellik verir. Agardaki agaroz/agaropektin oranı ham maddeye göre değişir. Agardaki agaroz oranı en çok %75'e kadar çıkabilir. Özel çalışmalarda saf agaroz kullanılır.

Agar, besiyeri bileşimine sadece jelleştirici olarak katılır. Uzun ve dallanmış zincir yapısı nedeniyle -bir kaç istisna dışında- mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılamaz.

Yaklaşık olarak 85–90 °C'da erir, 40–45 °C'da jelleşir. Gerek erime gerek jelleşme sıcaklığına besiyeri pH'sı etkilidir. Besiyeri pH'sını etkilemez, ancak düşük pH'dan olumsuz şekilde etkilenir. 6'dan daha düşük pH'ya sahip besiyerlerinde genel olarak daha fazla agar kullanılır. pH'sı 5 ve daha altında olacak ise, bu besiyeri nötral pH'da otoklavlanır ve 45 °C'a soğutulup, gerekli miktar asit ilave edilir. Bu şekilde hazırlanmış besiyerleri tekrar eritilirse agar jelleşme özelliğini tümüyle yitirir.

Agarın jelleşme sıcaklığı literatürde 32–39 °C olarak verilmektedir. Döküm sırasında Petri kutularının oda sıcaklığında (20 °C) olduğu ve dolayısıyla Petri kutusu ile besiyeri arasında ısı değişimi olacağı dikkate alınarak döküm sıcaklığının 40–45 °C kadar olması gerekir.

Besiyerine amaca göre %0,05–2 gibi geniş bir sınırdan ilave edilebilir. Düşük agar konsantrasyonları (%0,05–0,3) genellikle hareketliliğin belirlenmesi, mikroaerofil karakterdeki bakterilerin geliştirilmesi gibi özel amaçlarla kullanılır. Standart kullanım konsantrasyonu %1–1,5'tir. Yüksek konsantrasyonlar ise yüksek asitli besiyerlerinde agarın jelleşme özelliğini koruması amacıyla kullanılır. Yukarıda da belirtildiği gibi agar yüksek sıcaklıkta yüksek asitlikten olumsuz etkilenir. Daha yüksek agar konsantrasyonu bu olumsuzluğu gidermek içindir.

03.04.08. Karbohidratlar

Bazı besiyerlerinin bileşimine bakteriler için enerji ve karbon kaynağı olarak katılan karbohidratların bir başka kullanım şekli karbohidratlardan asit oluşturmaya dayalı identifikasyon testleridir (bakınız; 37.07. Bölüm).

Besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak en çok kullanılan karbohidratlar glikoz, laktoz ve sakkarozdur. Bunlardan glikoz pek çok bakteri tarafından kullanılabilirdiği için, daha çok genel besiyeri bileşimlerinde yer alır.

Adonitol, arabinoz, dekstroza (glikoz), dulsitol, galaktoz, inositol, inulin, laktoz, levuloz (früktöz), maltoz, mannitol, mannoz, melezitöz, melibiyöz, nişasta, rafinoz, ramnoz, sakkaroz (sukroz), salisin, sellobiyöz, selüloz, sorbitol, trehaloz ve ksiloz çeşitli karbohidrat testlerinde kullanılmak üzere çoğunlukla sıvı ya da katı besiyerlerine katılabilmektedir.

Glikoz, laktoz sakkaroz, mannitol gibi bazı karbohidratlar çeşitli katı besiyerlerine yine karbohidratlardan asit oluşumunun izlenmesi ve buna göre koloninin ön identifikasyonu amacı ile katılır.

Koliform grubu bakterilerin geliştirileceği besiyerlerinin hemen hepsinde karbon kaynağı olarak laktoz kullanılır. Koliformların analizi için hazırlanmış sıvı besiyerlerinde laktozdan gaz oluşumu bu grup için belirleyicidir. Gaz çıkışı basit olarak Durham tüpü ile belirlenir (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

Nişasta kullanımı (hidrolizi) bazı bakteriler için tipik olduğundan çeşitli özel besiyerlerinin bileşimine katılır.

Genel olarak karbohidratların çözelti halinde filtrasyon ile sterilize edilmesi önerilir. Çeşitli besiyerlerinin bileşimine katılan glikoz, laktoz, sakkaroz gibi şekerler besiyeri ile birlikte otoklavda da sterilize edilebilir.

03.04.09. Tuz

Aksine bir belirtme yoksa "tuz" denilince sodyum klorür anlaşılır. Çoğu besiyerinin bileşimine izotonik bir ortam oluşturmak için katılır. %0,85 NaCl, serum fizyolojik adı ile seyreltme çözeltisi olarak yaygın olarak kullanılır. Klinik birimlerde bu ad ile bilinen çözelti de budur ve insan vücudu için de aynı şekilde izotonik denge oluşturur.

Tuza dayanıklı (halotolerant) ve tuz seven (halofil) bakterilerin selektif izolasyonu için yüksek konsantrasyonlarda özel besiyerlerinin bileşimine katılır.

03.04.10. Tampon Maddeler

Mikroorganizmalar genel olarak nötr ve nötre yakın pH'larda iyi gelişir. Bazı mikroorganizmalar alkali pH'ları yeğlerken (örneğin *Rhizobium* bakterileri), bazıları (örneğin mayalar, küfler, asidofilik bakteriler) asidik ortamları severler.

Bir besiyerinde elden geldiğince çok sayıda mikroorganizma geliştirilmesi isteniyorsa pH nötre yakın değerde olmalıdır. Tersine olarak geliştirilmesi istenen mikroorganizma yüksek asitliğe veya yüksek alkaliliğe dirençli ise, besiyeri pH'sı bu mikroorganizmanın gelişebileceği pH'ya ayarlanmalıdır.

Asitlik/alkalilik, besiyerlerine selektivite kazandırmak amacıyla, çok kolay ve dolayısıyla çok yaygın olarak kullanılan bir faktördür. Örneğin maya ve küflerin, asidofilik bakterilerin geliştirileceği ortamlarda pH düşürülerek pek çok bakterinin gelişmesi kayda değer ölçüde baskılanır.

Metabolizmaya bağlı olarak besiyeri pH'sında değişimler meydana gelir. Sadece pepton olan ortamda geliştirilen bakteriler pH'yı yükseltir. Buna karşın bileşiminde pepton yanında karbohidrat da olan besiyerinde karbohidrat tükenmediği sürece pH düşer. Bazı çalışmalarda inkübasyon sırasında pH'nın değişmesi, geliştirilmesi istenen mikroorganizmaya zarar vereceği için istenmez. pH değişiminin minimumda tutulması amacıyla besiyerine çeşitli tampon maddeler ilave edilir.

Büyük ölçekli endüstriyel üretimlerde pH stabilitesi tampon eklenerek değil, belirli pH aralığında tutmak üzere "pH-stat" denilen sistemlerle dışarıdan asit ya da baz ilavesi ile yapılır.

Tampon (buffer) olarak en çok kullanılan maddeler, fosfatlar (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , β gliserofosfat), karbonatlar, asetatlar ve sitratlardır. Basit olarak, Skim Milk besiyerine 1 g/10 mL kalsiyum karbonat ilavesi ile laktik asit bakterilerinin oluşturduğu asitlik kayda değer ölçüde tamponlanır.

Çizelge 01'de 4,8–8,0 arasında tampon çözelti hazırlamak için kullanılan tamponlar gösterilmiştir. Buna göre;

Çözelti "A": 0,067 M KH_2PO_4 (9,073 g/L KH_2PO_4)

Çözelti "B": 0,067 M Na_2HPO_4 (11,866 g/L Na_2HPO_4).

Örnek: pH'sı 5,90 olan tampon çözelti hazırlanmak isteniyorsa, çizelgeden 5,90'ın karşılığı olarak 9,80 mL bulunur. Bu miktar "B" çözeltisinin (Na_2HPO_4) üzerine 100 mL'ye tamamlayacak şekilde 90,20 mL "A" çözeltisi (KH_2PO_4) eklenir. Besiyeri bileşimine giren maddeler tartılır, su yerine bu çözelti kullanıldığında besiyeri pH'sı 5,90'a tamponlanmış olur.

Hazırlanan tampon çözeltisinin güvenilir olması için, "B" çözeltisi üzerine "A" çözeltisi ekleme işleminin pH metre kontrolü ile yapılması önerilir.

Çizelge 01. Tampon çözelti hazırlamak için "B" çözeltisinden alınacak miktar (mL)

pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"
4,80	0,35	5,40	3,00	6,00	12,1	6,60	37,1	7,20	72,6	7,80	93,6
4,90	0,60	5,50	3,90	6,10	15,0	6,70	43,0	7,30	77,7	7,90	95,5
5,00	0,95	5,60	4,90	6,20	18,4	6,80	49,2	7,40	81,8	8,00	96,9
5,10	1,35	5,70	6,20	6,30	22,1	6,90	55,2	7,50	85,2		
5,20	1,80	5,80	7,90	6,40	26,4	7,00	61,2	7,60	88,5		
5,30	2,30	5,90	9,80	6,50	31,3	7,10	67,0	7,70	91,2		

* : Kaynak: www.kimyaevi.org. Bu çizelge, 2. desimali de gösteren şekilde bu sitede vardır.

03.04.11. pH İndikatörleri

Mikrobiyel metabolizma sonunda bazı besiyeri bileşenlerinden çeşitli asit veya alkali ürünler meydana gelir. pH'daki değişme en kolay olarak pH indikatörleri ile belirlenir ve bunların renk değişimine bağlı reaksiyonlar o besiyerinde gelişen mikroorganizmalar için önemli göstergeler olur.

Aşağıda, besiyeri bileşimlerinde yaygın olarak kullanılan pH indikatörleri ve pH'ya bağlı renkler verilmiştir.

Çizelge 02. pH İndikatörleri ve Renk Değişim Sınırları

İndikatör	Asit pH / renk	Alkali pH / renk
Fenol blue	3,0 / sarı	4,9 / mavi
Fenol red	6,8 / sarı	8,4 / kırmızı
Bromocresol green	3,8 / sarı	5,4 / mavi
Bromocresol purple	5,2 / sarı	6,3 / menekşe
Bromothymol blue	6,0 / sarı	7,6 / mavi
Cresol red	7,2 / sarı	8,8 / kırmızı
Litmus	5,6 / kırmızı	8,3 / mavi
Metil red	4,4 / kırmızı	6,2 / sarı
Neutral red	6,8 / kırmızı	8,0 / sarı
Rosalic acid	6,8 / sarı	8,2 / kırmızı

Bunlara ek olarak kimyasal analizlerde kullanılan pek çok pH indikatörü bulunmakla birlikte, besiyeri bileşimine girenler sınırlıdır. İndikatör, öncelikle geliştirilmesi istenen mikroorganizmaya zarar vermemelidir. Ayrıca besiyerinde stabilite, hedef pH'larda kesin renk dönüşümü vb. özellikleri de olmalıdır.

03.04.12. Redoks İndikatörleri

En yaygın olarak kullanılan redoks indikatörü TTC (2,3,5 Triphenyl-tetrazolium chloride)'dir. Enterokokların selektif geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılır ve buna bağlı olarak besiyeri bileşimlerinde yer alır.

Enterokoklar TTC'yi indirgeyerek kırmızı renkli bir bileşiğe (formazon) dönüştürür. Bu şekilde besiyerinde oluşan kırmızı renkli kolonilerin enterokok olduğu anlaşılır.

Resazurin, yaygın olarak kullanılan bir diğer redoks indikatörüdür. Çiğ sütlerde metabolizmaya dayalı bir sayım yönteminde kullanılmasına karşın, sütte antibiyotik ya da gelişmeyi engelleyici bir madde bulunması halinde doğru sonuç alınamaz. Bu konuda 07.05. Bölümde ayrıntılı bilgi verilmiştir.

03.04.13. Diğer İndikatörler

Mikrobiyel metabolizmaya bağlı olarak bazı kimyasalların çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşturdukları belirli ürünlerin saptanması, bu besiyerlerinde gelişen mikroorganizmaların ön identifikasyonunda kullanılır. Bu tip reaksiyonlarda kullanılan indikatör örnekleri aşağıda verilmiştir.

-MUG (4-Methylumbelliferyl- β -Glucuronide): *E. coli* tanımında son yıllarda en yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir. *E. coli* 'deki β -D-Glucuronidase (MUGase) enzimi MUG'u uzun dalga boylu (366 nm) UV ile floresan ışıma veren bir bileşiğe (methylumbelliferone) parçalar. MUG hakkında 14. Bölümde ayrıntılı bilgi verilmiştir. Floresan ışıma, loş bir ortamda belirgin bir şekilde görülür.

-MUP (methylumbelliferyl-phosphate): *Cl. perfringens* için karakteristik olan asit fosfataz enzimi MUP'u yine uzun dalga boylu UV ile floresan ışıma veren bir bileşiğe (methylumbelliferone) parçalar.

-Kan: Aksine bir uyarı yoksa besiyeri bileşimine giren "defibrine koyun kanı"dır. Hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi için kullanılır. Hemoliz reaksiyonları 37.13. ve kan hakkında bilgi 40.06. Bölümde verilmiştir. Gıda mikrobiyolojisinde *Listeria* tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır.

-Jelatin ve kazein: Bunlar, proteolitik bakterilerin belirlenmesi amacıyla besiyeri bünyesine katılır. Jelatin kullanılan yöntemde inkübasyon sonrası soğutulan besiyerinin katılaşmaması jelatinin hidrolize edildiğini gösterir. Kazein kullanılan yöntemde ise proteolitik bakteri kolonileri etrafında proteolize bağlı olarak berrak zonlar meydana gelir.

-Lesitin: Yumurta sarısı ve soya fasulyesinde bulunan lesitin, çeşitli bakterilerdeki lesitinaz enzim aktivitesi sonunda parçalanır ve lesitin katılmış katı besiyerinde koloni etrafında berrak zonlar görülür. Gıda mikrobiyolojisinde *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

-Kromojenik substratlar: Katı besiyerinde şeker ve pH indikatörüne bağlı selektif izolasyon sistemi yerine, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl, 5-bromo-6-chloro-3-indolyl ya da 6-chloro-3-indolyl gibi indolil türevleri olan kromojenik substratların kullanımı giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu sistemin prensibi, kromojenik substratın hedef bakteri ya da bakteri grubu için özgün olan enzim ile şeker ve kromojene parçalanması, oksijen varlığında sıvı besiyerinin ya da katı besiyerindeki koloninin renk değiştirmesidir. Klasik pH indikatöründen farklı olarak bu sistemde koloni etrafında zon oluşmaz, doğrudan koloni rengi değişir ve bu değişim pH'dan etkilenmez.

-Tributirin: Lipolitik aktivitenin belirlenmesi için kullanılır. Lipolitik bakteri kolonileri etrafında lipoliz sonunda berrak zonlar oluşur.

03.04.14. İnhibitörler

Selektif besiyeri bileşimlerinde, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini baskılayan çeşitli inhibitör maddeler kullanılır. İnhibitör maddelerin etki şekilleri çok farklıdır ve güçleri konsantrasyonlarına bağlıdır.

Bir yaklaşıma göre her maddenin yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi vardır. Örneğin, pek çok besiyerine ozmotik basınç sağlamak için katılan NaCl, yüksek konsantrasyonlarda pek çok mikroorganizmanın gelişimini engeller. Mikroorganizma için C kaynağı olarak kullanılan glikoz, %50 konsantrasyonda ozmofilik/ozmotolerant mayaların gelişimine izin verirken, diğer tüm bakteri, maya ve küflerin gelişimini inhibe eden bir etki gösterir.

Besiyerlerinde inhibitör olarak kullanılan maddeler genel ve selektif inhibitörler olarak kabaca ikiye ayrılabilir. Genel inhibitörler daha geniş bir spektrumda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini engellerken, selektif inhibitörler belirli mikroorganizmaların gelişimini etkiler.

İnhibitör etki, yukarıda belirtildiği gibi öncelikle konsantrasyona bağlıdır. Bunun dışında mikroorganizma cinsi ve hatta türü ile serotipi inhibisyonunda önemlidir. Örneğin, *E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli* 'ler ve refakatçi floraya oranla sefiksim-tellurit kombinasyonuna kayda değer ölçüde direnç gösterir. Belirli bir madde (örneğin tellurit), bazı bakteriler için inhibitör etki yaparken, bazı bakteriler telluriti metalik tellura indirger, sonuçta gri-siyah renkli koloni oluşumu stafilokok ve mikrokoklar için tipik bir morfolojik göstergedir.

İnhibitör olarak kullanılan maddenin görevi, istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini önlemek iken, gelişmesi istenen mikroorganizma için inhibitör etki yapmaması gerekir. Sadece belirli bir türün dışındaki tüm mikroorganizmaların gelişimini etkileyen inhibitör madde kullanımı oldukça enderdir. Örneğin, Cetrimide (cetyltrimethylammonium bromide) *Pseudomonas aeruginosa* dışında pek çok refakatçi florayı inhibe ettiği için *Pseudomonas* besiyerlerinin bileşiminde yer alır. Besiyerinde tek inhibitör yerine, birden fazla inhibitör de kullanılabilir.

İnhibitör olarak kullanılan tüm maddelerin hangi mikroorganizmalar için hangi konsantrasyonda ve hangi mekanizma ile inhibisyon etki sağladığını listelemek çok güçtür ve bu kitabın konu kapsamı dışındadır. Bununla beraber, en çok kullanılan inhibitörler hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir:

-Boyalar: Metakrom sarısı (metachrome yellow) *Proteus* kolonilerinin yayılmasını, eosin Y ve metilen mavisi (methylen blue) Gram pozitif bakterilerin gelişimini, malahit yeşili *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki pek çok refakatçi floranın gelişimini baskılar.

-Sodyum azid: Gram negatif bakterilerin gelişimini engeller.

-Safra tuzları (Bile salts, Ox bile): Gram pozitif bakterilerin gelişimini engeller.

-Antibiyotikler: Genellikle bakterileri engellemek için geniş spektrumlu olarak küf geliştirme besiyerlerinde ya da refakatçi bakteriyel florayı inhibe etmek için dar spektrumlu olarak kullanılırlar. Örneğin, *Bacillus cereus* refakatçi floraya göre Polimiksin B sülfattan daha az etkilendiği için, bu bakteri ile ilgili çalışmalarda besiyeri bileşimine katılır. Benzer şekilde *E. coli* O157:H7 serotipi ile ilgili çalışmalarda sefiksim yaygın olarak kullanılır.

-Deoksiçolat (Deoxycholate): Gram pozitif bakterileri, kısmen koliformları ve zayıf olarak *Shigella* 'yı engeller. *Salmonella* besiyerlerinin çoğunda bulunur.

Ayrıca, selenit, tetratyonat, bizmut, lauryl sülfat, yüksek konsantrasyonda asetat vb. maddeler çeşitli besiyerlerinde inhibitör madde olarak kullanılır.

03.04.15. Diğer Maddeler

Besiyerlerine çeşitli amaçlarla katılan ve yukarıdaki gruplara girmeyen daha pek çok madde vardır. Bunlardan bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

-İnaktivatörler: Lesitin, sistein, Tween 20, Tween 80 gibi maddeler başta ilaç ve kozmetik endüstrisinde ham madde, ara ürün ve son ürünlerindeki çeşitli antimikrobiyel maddeleri inaktive ederek bu gibi ürünlerde bulunması olası mikroorganizmaların belirlenmesini sağlarlar.

-Stimölätörler (Gelişmeyi teşvik ediciler): Analiz edilen örnekte gelişmesi istenen mikroorganizmayı teşvik etmek amacıyla besiyeri bileşimine çeşitli maddeler katılabilir. Bunlar arasında vitaminler, glisin, piruvat, Tween 80 ve çeşitli elementler ilk akla gelenlerdir.

-Özel besin maddeleri: Besiyerleri içinde gelişmesi istenen mikroorganizmanın kullanabileceği, diğerleri için besin maddesi olarak yararlanılamayacak çeşitli maddeler yer alabilir. Bunlara en tipik örnek azot kaynağı olarak nitrat (NO₃) kullanılmasıdır. Özel besin maddeleri olarak nişasta ve glutamat da kullanılabilir.

-İndirgeyiciler: Anaerobik ortam oluşturmak için çeşitli maddeler kullanılır. Bunlar arasında ilk akla gelen thioglycollate'tır.

-Doğal ortam oluşturanlar: Bazı bakterilerin gelişmesini teşvik etmek için onların doğal olarak bulundukları ortamlar besiyerine katılır. Örneğin, sütte bulunan bakteriler için süt tozu, deniz balıklarındaki bakteriler için deniz suyu besiyeri bileşiminde yer alır.

-İdentifikasyon amacıyla kullanılan bileşikler: Yukarıda ilgili bölümlerde identifikasyon amacıyla çeşitli kimyasalların besiyerleri bünyesinde yer aldığına değinilmiştir. Bunların dışında pek çok kimyasal madde çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere besiyerlerinin bünyesinde yer almaktadır. Üre, KCN, çeşitli aminoasitler (lisin, arjinin, ornithin vb.) identifikasyon amacı ile besiyeri bileşimine giren maddelerin tipik örnekleridir.

-Anorganikler: Mikroorganizmalar beslenme için çeşitli anorganik maddelere de gerek duyar. Çeşitli makro ve iz (mikro) elementler -başta peptonlar ve ekstraktlar olmak üzere- çeşitli besin maddelerinin bileşiminde yeterli miktarlarda bulunmakla birlikte, bu maddeler bazı besiyerlerine mikrobiyel gelişmenin sağlanması için katılmaktadır.

03.05. Besiyeri Çeşitleri

Besiyerleri, birbirinden farklı mantıklar altında gruplandırılabilir. Örneğin besiyerleri, fiziksel özelliklerine göre sıvı ve katı olmak üzere iki gruba ayrılırken, bir başka bakış açısı ile kaynağına göre bitkisel, hayvansal, sentetik, türev, karışık vb. şekillerde de sınıflandırılabilirler.

Besiyerlerinin kullanım amacına göre sınıflandırılması ise bir anlamda besiyeri bileşimleri ile doğrudan ilgilidir ve sınıflandırmada en yaygın olarak kullanılan uygulamadır. Kullanım amacına göre sınıflandırılmalarında da farklı yaklaşımlar vardır. Kimi araştırmacı ve kullanıcıya göre belirli bir grupta yer alan bir besiyeri, bir diğerlerine göre başka bir grupta sınıflandırılmaktadır. Aşağıda, "Kanlı Agar" besiyeri bu konuda tipik bir örnek verilmiştir.

Bu kitapta besiyerleri, kullanım amacına göre en çok kabul gören sınıflandırma şekline göre gruplandırılmıştır. Bu sınıflama şeklinde besiyerleri öncelikle "genel besiyerleri" ve "özel besiyerleri" olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Özel besiyerleri ise kendi içinde farklı alt gruplar altında değerlendirilir.

Bir yaklaşıma göre genel besiyerleri dışında kalan tüm besiyerleri "özel besiyerleri" grubuna girer.

03.05.01. Genel Besiyerleri

Herhangi bir inhibitör madde içermeyen, besin maddelerince yeterli veya zengin, herhangi bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak desteklemeyen, bazı zor gelişenlerin de dahil olduğu çok sayıda mikroorganizmanın gelişmesini sağlayan besiyerleridir.

Bu grupta değerlendirilen besiyerleri genel olarak bakteriler için kullanılır. Bununla beraber, bu besiyerlerinde maya ve küfler de gelişebilir. Benzer şekilde *E. coli* fajları ile ilgili bir çalışmada genel nitelikli bir besiyeri kullanılabilir.

Genel besiyerleri başlıca toplam mezofil aerob bakteri sayımı, toplam psikrofil aerob bakteri sayımı, bozulma ya da hastalık etmeninin ön izolasyonu gibi amaçlar için kullanılır. Buna göre;

- Başta gıda maddeleri olmak üzere pek çok örnekte "toplam mezofil aerob bakteri sayısı" ile "toplam psikrofil aerob bakteri sayısı" tayinleri önemli kalite kriterleridir. Toplam mezofil aerob bakteri sayısından kasıt 28–30 °C'da (kimi kaynaklara ve amaca göre 35–37 °C'da) gelişebilen aerob bakterilerin sayısıdır.

- Günlük kullanımdaki bakterilerin aktive edilmesi, basit olarak korunması vb. amaçlarla da genel besiyerleri yaygın olarak kullanılır.

- Nedeni hakkında bir ön fikir edinilemeyen bozulma ya da hastalık etmeninin izolasyonu için de genel besiyeri kullanılır. Burada amaç, etmenin her ne olursa olsun öncelikle izole edilmesidir ve genel bir besiyeri kullanmak bir anlamda zorunludur. Etmenin, zor gelişen bir mikroorganizma olabileceği varsayımı ile bu tip izolasyonlarda bunların gelişebileceği zenginleştirilmiş besiyerleri kullanmak daha doğru olur.

Tüm bakterilerin geliştirilebileceği nitelikte bir besiyeri yoktur. Genel besiyerleri zor gelişen bakterilerin sadece bir bölümünün gelişmesini sağlayabilir. Klinik mikrobiyolojide farklı gruptaki zor gelişen bakteriler için genel besiyerlerine başta kan olmak üzere katkılar ilave edilerek zenginleştirmeler yapılmaktadır. Gıda mikrobiyolojisinde bu tip uygulamalara genellikle gerek duyulmaz.

Genel besiyerleri, inkübasyon koşullarının değiştirilmesi ile psikrofillerin, termofillerin, mikroaerofillerin, aerotolerantların ve özel inkübasyon koşullarının sağlanması ile kısmen anaerobların geliştirilmesinde de kullanılır.

Gıda mikrobiyolojisi açısından ele alındığında, Plate Count Agar, Nutrient Agar ve Nutrient Broth, CASO (Tryptic Soy) Agar ve CASO (Tryptic Soy) Broth en sık kullanılan genel besiyerleri içinde yer alırlar.

Ayrıca, Brain–Heart (Infusion) Broth ve Brain–Heart Agar ile Tamponlanmış Peptonlu Su da genel besiyeri olarak değerlendirilir. Kanlı Agar ise, basit bileşimli bir genel besiyerine kan ilavesi ile hazırlanır.

Kanlı agar üzerinde bir diğer yaklaşım, besiyerlerinin kullanım amacına göre farklı gruplarda değerlendirebileceğini gösterir. Kanlı agar, klinik mikrobiyolojide standart genel besiyerlerinde gelişemeyen "zor gelişen" bakterilerin izolasyonu için kullanıldığında "zenginleştirilmiş genel besiyeri" olarak değerlendirilir. Gıda mikrobiyolojisinde elde edilen bir izolatın hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi amacı ile kullanıldığında ise identifikasyon besiyeridir. Bir klinik örnekten sadece β hemoliz yapan bakterilerin izolasyonu için kullanılıyorsa bu kez diferansiyel besiyeri olarak değerlendirilir.

03.05.02. Selektif Besiyerleri

Selektif besiyerleri, karışık bir mikrobiyel floradan gelişmesi istenmeyenleri olabildiğince fazla baskılamak, ancak gelişmesi istenenler için -tersine olarak- minimum düzeyde olumsuz etki yapmak üzere formülize edilir. Bu amaçla genellikle çeşitli inhibitör maddeler kullanılır.

İnhibitörlerin konsantrasyonu ile baskılanması hedeflenen mikroorganizmaların cins ve türlerine göre değişmek üzere, selektif besiyerleri bunlar için zayıf, orta veya yüksek selektivite gösterir.

Yüksek selektivite gösteren besiyerleri, tek cins ya da türde mikroorganizma gelişmesine izin vereceğinden bu besiyerleri selektif izolasyon, selektif sayım ve hatta ön identifikasyon amaçları ile kullanılabilir.

Bununla birlikte, sadece bir tür mikroorganizmanın gelişebileceği selektivitede besiyeri örneği çok azdır. Bu gibi örnekler, gelişmesi istenen mikroorganizmanın belirli bir inhibitöre aşırı direnç göstermesi ile ilgilidir.

Ozmofil mayalar ve halofil bakterilerin analizi için geliştirilen besiyerleri bunların tipik örnekleridir. Cetrimide Agar ise oldukça ender örneklerden birisidir.

Bir besiyerine selektivite kazandırılması sadece inhibitör madde ilavesi ile yapılmaz. Geliştirilmesi istenilen mikroorganizmanın kullanabileceği, ancak refakatçi mikroflora tarafından kullanılamayan besin maddeleri besiyerine karbon ve azot kaynağı olarak verilerek de selektivite sağlanabilir. Örneğin, gıda sanayisinde *Pseudomonas* aranması için kullanılan GSP Agar besiyerinde glutamat ve nişastadan başka besin maddesi yoktur.

Nişasta ve glutamat *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türleri tarafından besin maddesi olarak kullanılırken, gıda maddeleri, atık sular ve gıda endüstrisi ekipmanında bu bakteriler ile birlikte bulunan refakatçi mikroflora bu maddeleri metabolize edemediği için gelişemez. Bu maddeleri çok kısıtlı olarak kullanabilenler ihmal edilebilecek kadar küçük koloni oluştururlar.

Selektif besiyeri hazırlamak ve kullanmak; inhibitörlerin gelişmesi istenen mikroorganizmaya az da olsa bir miktar zarar verebilmesi, inhibitör kullanımı ile refakatçi flora inhibisyonun her zaman mümkün olmaması, bazı inhibitörlerin insan sağlığına zararlı olması vb. nedenlerle her zaman istenilen sonucu vermemektedir.

Mikrobiyolojide besiyeri olarak selektif ortamlar yerine diferansiyel besiyerlerinin hazırlanması ve kullanılması ile çoğu kez tatmin edici sonuçlar alınmaktadır.

03.05.03. Diferansiyel (Ayırt Edici, Fark Ettirici) Besiyerleri

Diferansiyel besiyerlerinde gelişmesi istenen mikroorganizma yanında diğer mikroorganizmalar da gelişebilir. Ancak başta koloni morfolojisi olmak üzere çeşitli farklılıklar ile hedef mikroorganizma diğerlerinden ayrılır. Bu tanımlamaya göre diferansiyel besiyerleri, zayıf ve orta güçte selektivite gösteren selektif besiyerlerinin modifikasyonu olarak nitelendirilebilir.

Ayırt edici koloni özelliği, çeşitli pH indikatörleri, boya maddeleri, indirgeyiciler, diğer indikatörler vb. maddelerin besiyerine ilavesi ile yapılır. Pek çok mikroorganizma belirli bir karbohidratı kullanırken asit oluşturur ve bu asitlik pH indikatörü ile kolayca belirlenebilir. Ayrıca mikroorganizmanın jelatinaz, lipaz, lesitinaz vb. enzim aktiviteleri besiyerinde oluşan berrak zonlar ile belirlenebilir.

Bu besiyerleri sıvı ya da katı olabilir. Katılardan koloni izolasyonu mümkündür, ancak sıvı besiyerinde sadece hedef mikroorganizmanın var/yok olduğu anlaşılır.

Örneğin, koliform grup bakteriler için laktozdan gaz oluşturulması tipik bir ayırt edici özelliktir ve gaz oluşumu Durham tüpleri kullanılarak belirlenir. Gaz görülen tüpte koliform grup bakteri olduğu kesindir. Ancak, diğer bazı bakteriler besiyerinde gaz oluşturmada gelişebilir (bakınız 03.03.04. Bölüm).

Diferansiyel besiyerinde gelişen mikroorganizmaların ayrımı koloni morfolojisi, enzimatik aktivitelerin belirlenmesi, gaz oluşumunun izlenmesi vb. çıplak gözle yapılabileceği gibi, floresansa dayalı olarak kolayca yapılabilir.

Diferansiyel besiyerleri sadece selektif besiyerlerinin bir modifikasyonu değildir. Çeşitli genel besiyerlerine ilave edilen özel bazı katkıları bu besiyerlerine diferansiyel bir nitelik kazandırabilir.

Hemoliz reaksiyonları için kullanılan kanlı agar besiyeri bunun en tipik örneğidir. EC Broth'a MUG ilave edilerek hazırlanan bir besiyerinde, fekal koliform bakteriler yanında *E. coli* analizi de floresan testi ile yapılabilir.

Diferansiyel besiyerleri, amaca göre selektif izolasyon, selektif sayım ve ön identifikasyon amaçları ile kullanılmaktadır.

03.05.04. Zenginleştirme Besiyerleri

Karışık bir mikroflora içinde hedeflenen bir mikroorganizmayı geliştirmek, sayısını artırmak, hücrede olası hasarların giderilmesini sağlamak vb. amaçlarla kullanılan zenginleştirme besiyerleri, ön zenginleştirme besiyerleri ve selektif zenginleştirme besiyerleri olarak 2 alt gruba ayrılır.

Ön zenginleştirme besiyerleri genel olarak hasar görmüş (yaralanmış, stres altında) mikroorganizmaların aktivitelerini kazanmaları için kullanılan, bileşiminde inhibitör içermeyen, dolayısı ile aktivite kazanması istenen mikroorganizma yanında refakatçi mikrofloranın da gelişmesini sağlayan sıvı besiyerleridir. Buna göre "özel amaçla kullanılan genel besiyerleri" olarak da nitelendirilebilirler.

Bu besiyerlerine en tipik örnek, gıdalarda *Salmonella* aranmasına yönelik çalışmaların ilk aşaması olan ön zenginleştirmede kullanılan "Tamponlanmış Peptonlu Su" besiyeridir. Bileşimi 10 g/L et peptonu, 5 g/L NaCl ve 10 g/L fosfat tampon olan bu besiyerinde *Salmonella* yanında ortamdaki diğer bakteriler de kolaylıkla ve iyi bir şekilde gelişebilir.

Selektif zenginleştirme besiyerleri ise özel amaçla kullanılan selektif sıvı besiyerleridir. Bunlara en tipik örnekler *Listeria* ve *Salmonella* aranmasında kullanılan besiyerleridir.

Selektif zenginleştirme aşamasında karışık kültür olarak bulunan bakterilerden gelişmesi istenmeyenler, çeşitli selektif inhibitörlerin kullanımı ile kısmen ya da tümüyle engellenir.

Selektif zenginleştirme aşamasını genellikle selektif bir katı besiyerine sürme yapılarak aranan bakterinin selektif izolasyonu aşaması izler. Buna göre selektif zenginleştirmenin amacı, selektif izolasyonda başarı şansını artırmak için aranan bakterinin karışık kültür içindeki sayısını artırmaktır.

Selektif zenginleştirme aşaması, her zaman ön zenginleştirme aşamasını izlemez. Hedef bakteri ve analiz edilecek örneğe göre doğrudan selektif zenginleştirme ile de analize başlanabilir. Örneğin, *E. coli* O157:H7 analizi doğrudan selektif zenginleştirme ile başlarken, *Listeria* analizinde ise yarı selektif zenginleştirme ve selektif zenginleştirme şeklinde bir uygulama vardır.

Klinik mikrobiyolojide ise *Salmonella* kuşkusu duyulan dışkı örneği selektif zenginleştirme aşamasına alınmakta, hatta gerekirse bu aşama bile geçilip, selektif katı besiyerine sürme yapılmaktadır. Bu uygulamanın nedeni, tüm zenginleştirme aşamalarının bağırsakta bitmiş olmasıdır. Diğer bir deyişle, dışkıda aktif ve yüksek sayıda *Salmonella* varsa bunu zenginleştirmeye gerek yoktur.

03.05.05. İdentifikasyon Besiyerleri

Selektif ve diferansiyel besiyerlerinin ön identifikasyonda kullanılabileceğine yukarıda değinilmiştir.

Tam selektif bir besiyerinde gelişen bir mikroorganizmanın identifikasyonu cins ve hatta tür bazında tamamlanabilir. Diferansiyel besiyerlerinde de aynı durum geçerlidir. MUG içeren bir selektif katı besiyerinde floresan veren koloni *E. coli* olarak değerlendirilir.

Bir mikroorganizma izolatının tanımlanması için halen en çok kullanılan testler biyokimyasal nitelikli olanlardır. İdentifikasyon besiyerleri, mikroorganizmanın belirli bir besin maddesini (örneğin, laktoz) kullanıp kullanmadığının saptanması, belirli bir besin maddesinden metabolizma sonunda tayin edilebilecek metabolitleri (örneğin, triptofandan indol) oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi vb. amaçlar ile kullanılır. Bakterinin hareketli olup olmadığının saptanması amacıyla kullanılan yarı katı besiyerleri de bu gruba dahil edilmektedir. Yarı katı olarak Nutrient Agar gibi genel besiyeri ya da SIM Medium gibi kombine bir besiyeri kullanılabilir.

Bir besiyerinde birden çok mikrobiyolojik tanımlama testi aynı anda beraberce yapılabilir. Bunun en tipik örneği *Salmonella* analizinde yaygın olarak Triple Sugar Iron Agardır. Yatık agar olarak tüplerde hazırlanan bu besiyerinde tek ekim ile glikoz, laktoz ve sakkarozdan asit oluşturma, glikozdan gaz oluşturma ve H₂S oluşturma testleri yapılmaktadır. Bu gibi identifikasyon amaçlı ve birden çok test uygulananlar "kombine besiyeri" olarak adlandırılır.

03.05.06. Diğerleri

Agar disk difüzyonu ile yapılan antimikrobiyel duyarlılık ve minimal inhibisyon konsantrasyonu testleri, vitamin ve aminoasitlerin mikrobiyel yolla belirlenmesi, saf kültürlerin korunması (koleksiyonu), taşınması gibi özel amaçlara yönelik olarak kullanılan çeşitli besiyerleri de vardır.

Endüstriyel üretimde kullanılan besiyerleri ise oldukça farklı bir gruptur. Bunların dışında istenilen formülde "sipariş üzerine" üretilen besiyerleri de vardır. Bunlar talebe göre dehidre, sıvı, şişede ya da Petri kutusuna dökülmüş şekilde hazırlanabilmektedir.

03.06. Besiyerlerinin Hazırlanması

Laboratuvarlarda kullanılan pek çok besiyeri, dehidre formdan hazırlanır. Bu amaçla, gereken miktar dehidre besiyeri tartılıp, üzerine damıtık su eklenir ve gerekli ise başka kaplara (örneğin tüplere) dağıtılıp, sterilize edilir. Bazı besiyerlerinin formülünden hazırlanması gerektiği gibi, selektif besiyerlerinin bir kısmına sterilizasyon sonrasında çeşitli katkıları ilave edilir. Besiyerlerinin bir kısmı otoklavda, bir kısmı sadece kaynatılarak sterilize edilir.

Bir diğer deyiş ile, kullanılan besiyerlerine göre değişmek üzere bunların hazırlanma şekillerinde kayda değer ölçüde farklar vardır. Hatta bazen aynı besiyerinin 2 farklı ticari markası arasında bile hazırlanma farkı görülebilmektedir. ISO gibi uluslararası bir kuruluştaki yapılan talimat değişikliği, besiyeri formülüne ve dolayısı ile hazırlanış şekline de yansımaktadır. Bu gibi nedenlerle aynı marka kullanılıyor olsa da, besiyeri ambalajı üzerindeki bilgiler her zaman çok dikkatlice okunmalıdır.

Her besiyeri kutusunda, katalogunda ya da prospektüsünde, o besiyerinin nasıl hazırlanması gerektiği son derece basit ve 40–50 sözcükle İngilizce olarak yazmaktadır. Çoğunda İngilizce'ye ek olarak Almanca, Fransızca, İtalyanca vb. dillerde de açıklamalar bulunur.

Aşağıda besiyeri kutularında ve kataloglarında geçen bazı İngilizce sözcük ve terimlerin Türkçe karşılıkları gösterilmiştir. Bu kitabın 4. ana bölümünde gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren besiyerlerinin büyük çoğunluğunun hazırlama şekilleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

Gerek kutu üzerinde yabancı dilde yazan hazırlama bilgileri gerek ilgili talimatlarda kuşkuyla düşülür ise derhal bir üst yetkiliye danışılmalıdır.

Çizelge 03. Besiyeri hazırlamada yaygın olarak kullanılan İngilizce sözcük ve terimlerin Türkçe karşılıkları

İNGİLİZCE	TÜRKÇE
About	Yaklaşık
Add	İlave edin
Autoclave	Otoklav, otoklavlayın
Autoclave under mild conditions	Düşük sıcaklık ve sürede otoklavlayın
Avoid	Sakının, yapmayın
Below	Altında, daha düşük
Blue	Mavi
Boil	Kaynatın
Briefly	Yavaşça, hafifçe
Brown	Kahverengi
Caution	Uyarı, dikkat
Clear	Berrak
Completely	Komple, tümüyle
Cool	Soğutun
Dark	Koyu
Demin. water	Deiyonize (damıtık, saf) su
Dispense	Dağıtın
Dissolve	Eritin
Distilled water	Damıtık su
DO NOT ...	... Yapmayın
DO NOT AUTOCLAVE	(Besiyerini) otoklavda sterilize etmeyin
DO NOT OVER HEAT	(Besiyerini) fazla ısıtmayın
DO NOT REHEAT	(Besiyerini) tekrar ısıtmayın, eritmeyin
Filter–sterilize	Filtre ile sterilize edin
Filter–sterilized	Filtre ile sterilize edilmiş
Flask	Erlen
Frequent stirring	Sürekli çalkalayarak
Freshly	Taze, yeni hazırlanmış
Gently	Yavaşça, hafifçe
Green	Yeşil
Greenish	Yeşilimsi
Heat	Isıtın, ısıtmak
If	Eğer
Immediately	Derhal, hemen
Just before use	Kullanımdan hemen önce
Liquefy	Sıvılaştırma, eritme, eritin
Medium	Besiyeri

İNGİLİZCE	TÜRKÇE
Melt	Eritmek, eritin
Min(ute)	Dakika
Mix	Karıştırmın
Necessary	Gerekli
Over	Üzerinde, fazla
Pale	Soluk, mat
Plate(s)	Petri kutusu (kutuları)
Pour	(Petri kutularına) Dökün
Prepared	Hazırlanmış
Prior	Öncesinde
Red	Kırmızı
Reddish	Kırmızımsı
Refrigerator	Buzdolabı
Reheat	Yeniden ısıtmak, yeniden ısıtın
Reliquefy	Yeniden eritmek, yeniden eritin
Room temperature	Oda sıcaklığı
Selective supplement	Selektif katkı
Semi solid	Yarı katı
Shake	Sallamak, karıştırmak, sallayın, karıştırın
Slant (agar)	Yatık (agar)
Steam	Buhar
Store	Saklayın (depolayın)
Suitable	Uygun
Supplement	Katkı
Suspend	Çözün, eritin
Swarming	Yayılıcı
Swirl	Çalkalayın
Thick layer	Kalın tabaka
Thin layer	İnce tabaka
Thoroughly	Düzgün (tam) bir şekilde
Tube(s)	Tüp(ler)
Vial	Küçük şişe
Vigorously	Sertçe, kuvvetlice
Water	Su
Well	İyice
White	Beyaz
Yellow	Sarı
Yellowish	Sarımsı

*Kaynak: www.mikrobiyoloji.org

03.06.01. Cam Malzeme

Besiyeri hazırlamada kullanılacak cam malzemenin çok iyi bir şekilde yıkanmış ve durulanmış, besiyeri hazırlamada kullanılan kalitede sudan geçirilmiş ve yeterince kurutulmuş olması gerekmektedir. Kırık ve çatlak cam malzeme kullanılmamalıdır. Besiyerinin hazırlanacağı cam malzemenin yeterli büyüklükte olması çoğu kere ihmal edilen, ancak çok önemli bir ayrıntıdır. Cam kapların hacmi mutlaka yeterli bir karıştırma sağlanacak ölçüde olmalıdır.

İdeal olarak, hazırlanacak besiyeri hacminin yaklaşık 2 katı hacimde cam kap kullanılmalıdır. Sıvı besiyerleri için, besiyeri hacmi cam kap hacminin en fazla 3/4'ü olabilir.

Cam kabın büyük tutulmasının nedeni otoklavlama sırasında ısı geçişinin daha sağlıklı olması, otoklav sonrasında da rahat ve güvenilir çalışma sağlamasıdır. 1 litrelik bir erlende 1 litre besiyeri hazırlanırsa soğuk noktanın yeri nedeni ile ya soğuk nokta yeterince sterilize edilemeyecektir ya da çepere yakın yerler gereğinden fazla ısıya maruz kalmış olacaktır. Büyük miktarlardaki besiyerlerinin balonda hazırlanması aynı nedenle benimsenmez.

Besiyerleri hazırlamak amacıyla kullanılan her türlü cam malzemenin yüksek kalitede ve düşük alkaliborosilikat özellikte, otoklavda ve etüvde (kuru hava sterilizatörü) sterilizasyona dayanıklı olması gereklidir.

03.06.02.Tartım ve Eritme

Tartımın yapılacağı terazinin duyarlılığı, besiyerinin hazırlanış şekli ile doğrudan ilgilidir. Genel olarak günlük kullanımda 0,1 gram duyarlılıktaki terazi kullanımı yeterlidir. Bileşimden giderek az miktarda hazırlanan besiyerlerinde bu duyarlılık yeterli olmaz ise seyreltme tekniği uygulanabilir ya da daha duyarlı bir terazi kullanılabilir. Özellikle bileşimden hazırlanarak çok düşük miktarda tartım yapılacak ise, terazinin kalibrasyonuna özellikle önem verilmelidir.

Tartım için özel tartım kayıkçıkları ya da küçük beherler kullanılmalı, doğrudan erlen ya da balona tartımdan olabildiğince kaçınılmalıdır. Özellikle bileşimden hazırlamalarda tartım sırasında her madde için temiz spatül (kaşık) kullanılması, besiyeri ve/veya besiyeri bileşenlerinin kapakları açıldıktan sonra hata yapmamaya özen gösterilerek tartımın elden geldiğince çabuk bitirilmesi ve besiyeri kapağının sıkıca kapatılması gerekir. Tartım sırasında besiyeri ve/veya bileşenlerinin çok az da olsa toz bulutu oluşturmamasına özen gösterilmeli, eğer toz bulutu oluştu ise kesinlikle solunulmamalıdır.

Tartım sırasında besiyeri ve/veya bileşenlerinin çıplak deriye ve özellikle göze temas etmemesi sağlanmalıdır. Eğer bu temas varsa bol su ile ivedilikle yıkanması gerekir. Bu tip ayrıntılara NaCl, sakkaroz gibi günlük hayatta sürekli iç içe olunan maddelerin de dahil edilmesi, laboratuvar disiplini açısından son derece önemlidir. Bunun dışında, dehidre besiyerlerinin hepsinin higroskopik olduğu, solunulması halinde solunum sisteminde zamanla hastalıklara neden olabileceği, bazı besiyeri bileşenlerinin toksik olduğu göz ardı edilmemelidir.

Tartım sonrasında oluşabilen toz bulutu terazinin iç parçalarına girerek, terazide fark edilemeyecek arızalara neden olur ve bunun sonucunda hatalı tartımlar yapılır. Bu nedenle tartım sonrasında terazi üzerinde toz oluşmuş ise yumuşak fırça ile temizlenmeli ve damıtık su ya da %70 etil alkol ile silinmelidir.

Besiyerine ilave edilecek su ayrı bir ölçü silindirinde bulundurulmalıdır. Prensip olarak suyun hacmi ile silindirin hacmi birbirine yakın olmalıdır. Bir diğer deyiş ile 100 mL su ölçmek için 1 litrelik silindir kullanılmamalıdır.

Suyun yaklaşık 1/3'ü uygun bir kaba aktarılır, bunun üzerine tartılmış dehidre besiyeri ilave edilir. Bu uygulama ile cam kabın tabanına dehidre besiyerinin yapışarak erimemesine bağlı sterilizasyon yetersizliğinin önüne geçilir.

Daha sonra suyun geri kalan kısmı cam kap boğazında ve iç çeperlerde kalmış olabilen besiyeri parçacıklarını yıkayarak kaba ilave edilir.

Bazı besiyerleri soğuk suda kendi halinde 5–10 dakika bırakılıp elle hafifçe bir çalkalama sonunda tümüyle eriyebilir. Bazı besiyerleri ise "Broth" formunda olsalar bile eritilmeleri için mutlaka ısıtılmalarına gerek vardır. Agarlı besiyerleri hazırlandığı kapta otoklavlanacak olsa bile, önce agarın erimesini sağlayacak şekilde ısıtılmalı, iyice karıştırılıp sonra otoklavlanmalıdır.

Eğer besiyeri sıvı ise, dehidre besiyeri ya da besiyeri bileşenleri tümüyle eridikten sonra daha küçük cam kaplara dağıtılır ya da doğrudan sterilize edilebilir.

Besiyeri bileşiminde agar varsa ve daha küçük hacimli kaplara dağıtılması gerekli ise besiyeri ısıtılıp, agar tam olarak eritildikten sonra sürekli karıştırılarak 50–55 °C'da su banyosunda tutulurken dağıtılması gereklidir. 60 °C üzerindeki agarlı besiyerinin 25 mL'lik pipetle tüplere dağıtılması sırasında, eğer pipet ağızla çekilirse ağızda önemli yanmalara neden olabileceği unutulmamalıdır.

Özellikle agarlı besiyerlerinin otoklav öncesinde agarın mutlaka tam olarak eritilmesi için farklı uygulamalar söz konusudur. Bunlar arasında mikrodalga fırın, kaynar su banyosu, ısıtıcı tabla yaygın olarak kullanılır.

-Mikroalga fırın anı ısınmalara ve kaynamalara neden olacağı için dikkatli kullanılması gerekir. Besiyerinin kaynadığının görülmesi, agarın eridiği anlamına gelmez, ısının tüm besiyeri kütesine eşit olarak dağıtılmış olması gerekir. Bu nedenle mikroalga fırın kullanılarak eritme yapıldığında, kaynamadan sonra erlen tercihen manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmalı, erlen iç çeperinde agar ya da diğer besiyeri partiküllerinin kalmadığından emin olunmalı, endişe edilirse tekrar mikroalga fırına konulmalı ve yeniden karıştırılmalıdır. Manyetik karıştırıcıda kullanılan manyetin (balık) mikroalga uygulaması sırasında erlenden çıkartılması önerilmektedir.

-Laboratuvarlarda genel olarak "sıcak su banyosu" bulunur. Çoğunun ulaşacağı en yüksek sıcaklık 80 °C'dır ve buna bağlı olarak agarlı besiyeri eritilmesinde kullanılamazlar. Erleni rahatça içine alacak ve su kaynatmaya uygun herhangi bir kap bu amaçla kullanılabilir. Bu amaç için tercihen "benmari" şeklindeki kaynar su banyoları kullanılmalıdır.

-Isıtıcı tabla kullanılıyorsa manyetik karıştırıcılı olanlar tercih edilmelidir. Aksi halde sürekli olarak elle karıştırılıp, erlen dibinde kalabilecek erimemiş parçaların yapışmasına ve yanmasına neden olunmamalıdır. Eritme amacıyla kullanılan ısıtıcı tablanın iş bitiminde kolaylıkla soğumadığı ve çeşitli laboratuvar kazalarına neden olduğu da unutulmamalı ve laboratuvar personeli bu konuda uyarılmalıdır.

-Erlen açık alevde ısıtılarak besiyeri eritme yoluna gidilmemelidir.

Eritme sırasında erlenin ağzı alüminyum folyo ile hafifçe kapatılarak buharlaşma ve buharın laboratuvara dağılması önlenmelidir. Eritme işleminin -başta agar olmak üzere- bileşenlerin tam olarak eritilmesi amacıyla yapıldığı, günlük kullanılan besiyerlerinde en zor eriyen bileşenin agar olduğu ve 90 °C'da eridiği, bunlara dayanarak besiyerinin kaynatılmaması gerektiği unutulmamalı, ancak bileşenlerin tam olarak eritilmiş olduğundan da emin olunmalıdır.

Otoklavlama öncesi ısıtarak eritme dikkatli yapılması gereken bir iştir. Sürekli karıştırılarak yapılmalıdır. Aksi halde tam erimemiş partiküllerin yanmasına neden olunabilir. Özellikle düşük miktarda agar içeren besiyerleri eritme sırasında aniden kaynayarak kaptan taşabilir. Besiyeri hafifçe çalkalandığında erlen iç çeperinde partikül kalmaması erimenin tam olarak gerçekleştiğini gösterir.

Besiyerine ilave edilecek su miktarı çoğu kez hatalı ölçülür. Örneğin, besiyeri hazırlamada "dehidre hazır besiyerinden 23 gram, 1 litre suda çözülür" şeklindeki bildirinin anlamı 23 gram dehidre besiyeri üzerine toplam 1 litre su ilave edilmesi demek değildir. Erlen ya da balona önce 1 litre su doldurulur, cam yazar kalemle su düzeyi hassas bir şekilde işaretlenir, suyun yarısından fazlası bir başka temiz kaba alınır, tartım yapılır, besiyeri ya da besiyeri bileşenleri bu kaptan -agar hariç olmak üzere- eritilir, işaretli yere kadar damıtık su ilave edilir. Sonra tam eritme sağlanır.

Burada ilave edilecek toplam su hacmi 1 litreden daha az olacaktır. Az olan kısım dehidre besiyerinin hacmi kadardır. Pek çok ulusal ve uluslararası standart bu nedenle besiyeri hazırlanmasında "1 litre su ilave edilir." yerine "1 litreye su ile tamamlanır." şeklinde bir açıklama getirmiştir. Bu uygulama standart besiyerlerinin hazırlanmasında ihmal edilebilecek bir ayrıntı iken, özellikle %50 Glikoz Broth gibi besiyerlerinin hazırlanmasında çok önemlidir.

03.06.03. pH Ayarlama

İster ticari olarak hazırlanmış dehidre besiyeri hazırlama katalogları ve prospektüslerinde ister bilimsel çalışmalara yönelik literatür bilgisinde olsun, besiyeri pH'sından kasıt, sterilizasyon sonu ve oda sıcaklığındaki (25 °C) pH'dır. Usulüne uygun olarak depolanmış ve raf ömrü bitmemiş ticari dehidre besiyerlerinde nötral su ve temiz cam malzeme kullanılması, besiyerinin doğru hazırlanması ve sterilizasyonun sulandırmadan sonra vakit geçirmeden yapılması ile besiyeri pH'sında bir sorun çıkmaz.

Besiyeri pH'sının sterilizasyon öncesi ayarlanması yanlış olur. Çünkü sterilizasyon sonrasında pH az da olsa değişir. Dolayısı ile besiyeri pH'sının sterilizasyon öncesinde ayarlanması, sterilizasyon sonrasında yanlış pH elde edilmesine yol açar.

Sterilizasyon sonrasında pH ayarlanması gerekli ise, aseptik koşullarda alınacak belirli bir hacimdeki besiyerinde titrasyon ile pH ayarlaması yapılır, basit orantı ile asıl kaptaki besiyerine ilave edilecek asit ya da alkali miktarı hesaplanır.

Aksine bir belirtme yoksa, pH ayarlamasında filtre kullanılarak sterilize edilmiş olan 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılır. Sıvı besiyerinde pH ayarlaması, katı besiyerine göre çok daha kolaydır. Katı besiyerinde pH ölçüm ve ayarlama işleminin agarın jelleşme sıcaklığının üzerinde yapılması, pH metre kullanılıyor ise sıcaklık düzeltilmesine dikkat edilmesi gereklidir.

Tüpte hazırlanacak sıvı besiyerinde pH ayarlaması gerekli ise, besiyeri erlende otoklavlanmalı, otoklav çıkışında pH ayarlanmalı ve sonra steril tüplere dağıtım yapılmalıdır. Bu amaçla besiyerinden 10 mL gibi küçük bir örnek alınır, pH'sı kontrol edilir, 0,01 N NaOH ya da 0,01 N HCl kullanılarak pH'nın istenilen değere gelmesi için gereken miktar belirlenir, sonra orantı ile asıl besiyerine daha derişik (1 N) asit ya da baz ilave edilir.

pH ayarlaması için pH kağıdı da kullanılabilir. Bunun için ölçüm ve ayar yapılacak sınırları açıkça gösteren pH kağıdı kullanılmalıdır. pH kağıdı ile yapılan ölçümün çok duyarlı olmadığı, sadece "fikir vereceği" göz önünde tutulmalıdır.

Potato Dextrose Agar, BAT Agar örneklerinde olduğu gibi besiyeri çok asitli ise, sterilizasyon sonrasında asit ilave edilir.

Örneğin, Potato Dextrose Agar otoklavlanıp, 45 °C'a soğutulduğunda üzerine filtre ile sterilize edilmiş %10 tartarik asit çözeltisinden 14 mL/L olacak şekilde ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Bu işlem ile pH 5,6'dan 3,5'e düşürülmüş olur. Günlük uygulamada talimatta gösterildiği şekilde asit ilavesinden sonra pH kontrolüne gerek yoktur. Ancak, ilgili talimata göre asit ilavesinden sonra pH kontrolü isteniyor ise buna tümüyle uyulmalıdır.

Çeşitli bakterilerin tanımlama testleri içinde yer alan "belirli bir pH'da gelişebilme" gibi analizlerde besiyeri pH'sı tam olarak ayarlanmalıdır. Bu gibi analizlerde pH metre kalibrasyonunun son derece önemli olduğu açıktır.

Her ne kadar, "Doğru depolanmış taze besiyeri ile taze hazırlanmış damıtık su kullanılıyor, tartım doğru yapıyor ve kurallarına uygun olarak sterilizasyon yapılıyor ise besiyeri pH'sının her defasında kontrolüne gerek yoktur." şeklindeki görüş geçerli olmakla beraber;

-En azından ayda bir kez sıvı besiyerlerinde otoklav sonrası kalibrasyonu yapılmış pH metre ile besiyerinde pH kontrolü yapılmalıdır.

-Gıda işletmelerinin iç standardında her otoklav sonrasında pH kontrolü varsa buna mutlaka uyulmalıdır.

03.06.04. Katkıların İlavesi

Çeşitli antibiyotikler, vitaminler, kan ve yumurta sarısı başta olmak üzere besiyeri bileşimine giren bazı maddeler otoklavlama sırasında tahrip olur ya da yüksek sıcaklıkta bileşimdeki maddeler birbirleri ile reaksiyona girer. Bunun en tipik örneği asit–agar etkileşimidir. Bu gibi maddeler otoklav sonrasında bazal besiyerine ilave edilir.

Sıvı besiyeri için katkıların ilavesinde herhangi bir sorun yoktur. Besiyeri ve katkı maddeleri oda sıcaklığında aseptik olarak karıştırılır.

Agarlı besiyerlerinde ise katkı maddeleri agarın henüz sıvı formda kalabildiği yeterince düşük bir sıcaklıkta ilave edilir. Bu ilavede aşağıdaki konulara dikkat edilmesi gerekir:

-Katkı maddesi asla soğuk olmamalı, oda sıcaklığında hatta 30–35 °C'da, agarlı besiyeri ise 45–50 °C'da tutulmalıdır. Böylelikle bazal (agarlı) besiyerlerinde katkının ilavesi ile ani soğumalar ve yerel jelleşmeler önlenmiş olur.

-Katkı ilave edilecek agarlı (bazal) besiyeri içine sterilizasyon öncesi manyet atılarak beraberce sterilize edilmesi, katkı ilavesinden sonra manyetik karıştırıcıda hafifçe karıştırarak katkının besiyeri içinde yeknesak olarak dağılması sağlanabilir. Bu işlemde, anafor oluşturacak kadar hızlı yapılan karıştırma ani soğumalara ve/veya besiyeri içinde hava kabarcığı oluşumuna neden olur. Anafor oluşturacak kadar hızlı karıştırma, Petri kutularına döküm ve jelleşme sonrasında hava kabarcıkları görülmüyor ise karıştırma işleminin, dolayısıyla katkı ilavesinin agarlı besiyeri çok sıcak iken yapıldığı anlaşılır.

-Sıvı besiyerine de sterilizasyon öncesi manyet atılması yararlı olur. Ancak bu manyet -eğer kullanılacak ise- blender gövdesine ya da stomacher torbasına zarar verir. Bu nedenle manyet, karıştırma işlemi bittikten sonra erlenden çıkartılmalıdır.

-Katkı ilave edilmiş agarlı besiyeri hızla Petri kutularına dökülmelidir. Aksi halde katkı yüksek sıcaklıktan olumsuz etkilenir ve sahte negatif sonuçlar alınabilir. Asit ilave edilmiş ise agarın jelleşme gücü zayıflar.

Başta antibiyotikler olmak üzere katkı maddelerinin büyük bir kısmı steril olarak pazarlanır. Yumurta sarısı içeren çözeltiler pastörize edilmiştir ve bunların steril olduğu kabul edilir. Asitler ve vitaminler ile bazı şekerlerin filtre ile sterilize edilmesi gerekir. Kan, -sağlıklı hayvandan aseptik koşullar altında alındığı için- steril olduğu kabul edilir.

Katkılardan; yumurta sarısı içerenler gibi bir kısmı sıvı halde, antibiyotikler gibi bir kısmı ise küçük şişelerde (vial) liyofilize formdadır. Bunların üzerine gereken miktarda steril damıtık su (bazen su ve alkol) ilavesinden sonra sterilize edilmiş besiyerine eklenirler.

Küçük şişeler içinde bulunan ve genellikle antibiyotik içeren selektif katkılar şişe içinde tablet gibi durur. Bunlar kırılmış gibi görülüyorsa sulandırılmaları sırasında toz oluşturmayacak şekilde dikkatlice su ilave edilmelidir. Bu katkılar, kendi halinde bırakıldığında genellikle birkaç dakika içinde çözülür. Dairesel yavaş hareketlerle çalkalama erimeyi kolaylaştırır. Çözündürme sırasında kauçuk kapağa sıvının bulaşmamasına özen gösterilmeli ve şişe içeriğinin tam olarak çözülmüş olduğu kontrol edilmelidir.

Küçük şişelerde pazarlanan katkılar genellikle 500 ya da 1000 mL besiyeri için hazırlanmıştır. Buna göre bazal besiyeri hazırlanır, otoklavlanır, soğutulduktan sonra üzerine katkı ilave edilir.

Katkılar, genel olarak belirli bir miktar besiyerinde 1 kerede kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Örneğin, 50 mL yumurta sarısı tellurit emülsiyonu 1 L Baird-Parker Agar hazırlanması içindir ve bu miktardan standart çaplı 80 Petri kutusu hazırlanır. Pratik uygulamada, 1 şişe katkının tümünün 1 defada kullanılması beklenmez.

Bu durumda katkıdan steril koşullara uyularak gereken miktarın alınmasından sonra yine steril koşullara uyularak ağzının kapanmasına özen gösterilmelidir.

Benzer şekilde sadece antibiyotik içeren katkıların da depolanması mümkündür. Bu konuda 03.07.03. Bölümde bilgi verilmiştir.

03.06.05. Petri Kutularına Döküm

Otoklav veya daha geniş tarifi ile ısıtılma işlemi ile sterilizasyon sonrası agarlı besiyerleri çoğunlukla Petri kutularına dökülerek kullanılır. Besiyeri dökülmeden önce, homojenliğinden emin olmak için çalkalanmalıdır. Agarlı besiyerlerinin diğer kullanış şekilleri arasında tüplerde yatık veya dik agar ile Roux şişelerinde kullanım sayılabilir. Bu diğer kullanım şekillerinde agarlı besiyeri genellikle anılan kaplarda sterilize edilir. Ancak, agarlı besiyerlerinin Petri kutularında sterilize edilmesi uygulanan bir yöntem değildir. Agarlı besiyerleri, her zaman erlen gibi büyük kaplarda sterilize edilir ve sterilizasyon sonrası steril Petri kutularına aseptik koşullarda dökülür. Bazı işletmelerde "el altında" bulundurma amacı ile eritilmiş agar tüplere dağıtılır, sterilize edilir ve bu şekilde korunur. Gerekğinde eritilip Petri kutusuna aktarılır.

Petri kutularına dökülecek agarlı besiyeri miktarı farklı kaynaklarda farklı değerler ile verilmektedir. Bu miktar, öncelikle Petri kutusu çapı ile ilgili olduğu için agarlı besiyeri döküldükten sonra kalınlığın "en az 2–3 mm" olması yaygın bir şekilde önerilmektedir. Bu kitapta önerilen standart dökme miktarı 12,5 mL'dir (100 mL agarlı besiyerinin 8 Petri kutusuna dağıtılması; standart 9 cm çaplı Petri kutusunda 2 mm kalınlık). VRB Agar besiyerinde dökme yöntemi ile kültürel sayımda 10 mL besiyeri dökülmesi, jelleştikten sonra üzerine 4–5 mL besiyeri ilavesi pek çok uluslararası standart tarafından önerilmektedir.

Agarlı besiyerinin otoklavlama sonrası Petri kutusuna hangi sıcaklıkta döküleceği konusunda pek çok yanlış uygulamaya rastlanmaktadır. Agarlı besiyeri için doğru uygulama şekli, otoklav sonrası besiyerinin yaklaşık 45 °C'a soğutulması ve bu sıcaklıkta Petri kutularına dökülmesidir. Yüksek sıcaklıklarda dökme, Petri kutusunun kapağı içinde aşırı su yoğunlaşmasına yol açar. Ayrıca yüzey kurutması daha uzun zaman alır.

Eğer Petri kutusunda "dökme yöntemi ile kültürel sayım" amacıyla önceden ilave edilmiş örnek varsa dökme sıcaklığı 40 °C'ı geçmemelidir. Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken bir diğer özellik, Petri kutusunda bulunan mikroorganizmaları olası termal şok zararlarından korumak için Petri kutularının oda sıcaklığında tutulması gerekliliğidir.

Herhangi bir nedenle otoklavlandıktan sonra 50 °C su banyosunda uzun süreli beklemler agarın jelleşme özelliğinde kayıplara neden olur. 48 °C'da 4 saat beklemek izin verilebilecek en yüksek sıcaklık/süre kombinasyonudur.

Besiyeri döküldükten sonra Petri kutuları yatay bir zeminde soğumaya ve katılaşmaya bırakılır. Yayma yöntemi ile çalışılacak ise dökme sırasında besiyerinde oluşabilecek hava kabarcıkları bunzen beki alevi ile uzaklaştırılabilir.

Agarlı besiyerleri dökümden sonra bir süre depolanacaksa Petri kutularının tabanına döküm tarihi yazılmalıdır.

03.06.06. Kurutma

Petri kutularına dökülmüş agarlı besiyerlerinde yüzeyin ıslak olması istenmez. Islak yüzeylerde hareketli bakteriler yayıcı tip koloni oluştururken, hareketsizler olduklarından daha büyük koloni meydana getirir ve yanlış değerlendirmelere neden olur.

Tersine olarak, aşırı kurumalar da olumsuz sonuç verir. Koloniler aşırı kurumuş bir besiyerinde normalinden daha küçük boyut oluşturacakları için yine hatalı değerlendirmelere neden olur.

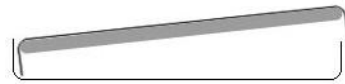
Kurallara uygun olarak Petri kutularına dökümde yüzey hafif nemli olur. Öze ile sürme gibi bir çalışma yapılacaksa, kurutma özellikle yapılmalıdır. Besiyerinin kurutma gerektirip gerektirmediği basit olarak yüzeyde su damlacıklarının görülmesi ile anlaşılır.

Dökümden sonra besiyeri yüzeyinin kurutulması gerektiğinde Şekil 05'te gösterildiği gibi 2 farklı yöntem uygulanabilir.

Şekil 05. Petri Kutularının Kurutulması



a) Çabuk kurutma



b) Güvenli kurutma

Petri kutularında agarlı besiyeri yüzeyinin çabuk kurutma yönteminde (a), kuruma hızlı olur, ancak kontaminasyon riski yüksektir. Diğer uygulama (b), tersine olarak geç kuruma ancak düşük kontaminasyon riski sağlar. Prensip olarak benimsenen şekil güvenli kurutmadır. Çabuk kurutma sadece acil durumlarda uygulanmalıdır.

Kurutma, mutlaka temiz ve serbest hava akımı olmayan yerlerde yapılmalıdır. Steril hava akımı ile çalışan aşılama kabini (Laminar air flow), sterilizasyon amacıyla kullanılan ve kurutma sırasında çalıştırılmayan etüvler (kuru hava sterilizasyon fırını) ve UV lamba ile sterilize edilen kabinler kurutma için kontaminasyon olmaması açısından en güvenilir yerler arasındadır. Kuru hava sterilizatörlerinde kurutma sırasında sıcaklığın 50 °C'da tutulması hızlı bir kuruma sağlar. Ancak bu uygulamada besiyerinin aşırı kuruma riski de vardır.

03.06.07. Yeniden Eritme

Sterilize edildikten sonra soğutulmuş ve jelleşmiş agarlı besiyerlerinin çeşitli nedenlerle yeniden eritilmesi gerekebilir. Burada ilk akla gelen iki neden, istem dışı olarak agarlı besiyerinin jelleşmesi ile besiyerinin her an kullanılabilecek şekilde elde hazır tutulmasıdır. Bazı ticari besiyerleri vida kapaklı şişe içinde pazarlanır. Bunların eritilmesi zaten zorunludur.

Hangi nedenle olursa olsun, jelleşmiş bir agarlı besiyerinin yeniden eritilmesi için 90 °C'da 1–2 dakika tutulma zorunluluğu vardır. Bu uygulama ise toplam ısı girişi açısından önerilmez. Bununla birlikte, pek çok laboratuvar da çeşitli besiyerleri arasında agarlı besiyerleri de sterilize edildikten sonra steril şekilde belirli bir süre depolanır. Bu uygulama daha çok günlük kontrol yapan laboratuvarlarda, örneğin, 1 hafta boyunca kullanılacak besiyerlerini bir kerede hazırlamak amacıyla yapılır.

Katkı ilave edilmiş agarlı besiyerinin yeniden eritilmesi söz konusu değildir. Benzer şekilde yüksek sıcaklığa duyarlı olan besiyerlerinde yeniden eritme önerilmez. Hatta bazı agarlı besiyerlerinin prospektüslerinde yeniden eritilmemesi gerektiğine özellikle dikkat çekilir.

Prensip olarak, katkı ilave edilmiş ve/veya otoklavda sterilize edilmeyen agarlı besiyerleri yeniden eritilmez. Düşük pH'lı besiyerlerini tekrar eritmekten kaçınılmalıdır, burada sınır olarak pH 6,0 verilmektedir.

Agarlı besiyerinin eritilmesi gerektiğinde elden geldiği ölçüde az ısı girişinin sağlanması, bu amaçla kaynar su banyosunda yaklaşık 90 °C'da tutularak erimenin gerçekleştirilmesi yeterlidir.

Eritme amacıyla otoklav da kullanılabilir. Bazı otoklavların 90 °C'a ayarlanması mümkün değildir. Bazılarında "eritme" seçeneği vardır. Otoklav bu amaçla kullanılacak ise asla sterilizasyon normunda değil, 105 °C'da 5 dakika süre ile ısı işlem uygulanmalıdır. Burada, eritilecek besiyeri hacminin önemli olduğu açıktır. Büyük hacimlerde besiyerlerinin eritilebilmesi için doğal olarak daha yüksek sıcaklık ve/veya süreye gerek vardır.

Eritme amacıyla aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Basit bir şekilde dairesel hareketlerle yapılan çalkalamada hava kabarcıkları merkeze toplanıyorsa besiyerinin tümüyle erimiş olduğu anlaşılır. Agarlı besiyerlerinin yeniden eritilmesinde mikrodalga fırınlar da başarıyla kullanılmaktadır.

Agarlı besiyerlerinin otoklav sonrası tekrar eritilmesinde performans azalması olur. Bu azalma, besiyerinin bileşimi ile doğrudan ilgilidir. Yeniden yapılacak eritmeler ile performans azalması kabul edilemeyecek düzeye çıkar. Bu nedenle agarlı besiyerinin sadece bir kez eritilmesine izin verilir.

Genel olarak Plate Count Agar gibi basit bileşimli besiyerleri daha az zarar görür. Otoklavlanmadan ve sadece ısıtılarak sterilize edilen besiyerleri (örneğin Rambach Agar) yeniden eritilmez.

Yeniden eritilmiş agarlı besiyerinin 3 saat içinde Petri kutularına dökülmüş olması gerekir. Laboratuvardaki iş akışı buna göre planlanmalıdır.

03.07. Depolama

Her dehidre besiyeri ve katkı kutusu üzerinde depolama koşulları belirtilir. Genel olarak dehidre besiyerleri oda sıcaklığında nem almayacak şekilde, katkılar buzdolabı sıcaklığında depolanır. Bununla beraber, kutu üzerindeki uyarılara dikkat etmek ve bunlara tümüyle uymak gereklidir. Hazırlanmış besiyerlerinin depolanma kuralları daha farklıdır.

03.07.01. Dehidre Besiyerlerinin Depolanması

Kapağı açılmış besiyerleri ve besiyeri bileşenleri kuru, karanlık ve serin bir yerde saklanmalıdır. Toz haldeki besiyeri ve bileşenleri için en büyük tehlike bunların nem almasıdır. Orijinal ambalaj kapağının açılmasından sonraki raf ömrü, saklama koşullarına doğrudan bağlıdır.

Kutu ilk açıldığı gün envanter kayıt defterine ve kutu üzerine açılış tarihi kaydedilmeli, ilk açıldığında renk, topaklanma ve kalıplaşma belirtileri için görsel olarak kontrol edilmelidir.

Dehidre besiyerinin kalitesindeki kayıp; toz akışında değişim, homojen yapı göstermeme, kalıplaşma, renk değişimi vb. ile anlaşılır. Nem almış ya da açıkça fiziksel değişim gösteren dehidre besiyerleri hiçbir koşulda mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

Salmonella–Shigella Agar besiyerinde şahit *Salmonella* kullanılarak yapılan bir çalışmada, kontrol örneğine kıyasla geri alma oranları %1,1 nem almış besiyerinde %47; %5,5 nem almış olanda ise %22 olarak bulunmuştur.

Nemden korumanın en emin yolu, kullanımdan sonra dehidre besiyeri kapaklarının sıkıca kapatılması ve bunların kuru bir yerde depolanmasıdır. Kutu açıldıktan sonra dehidre besiyerinin vida kapaklı renkli şişelere dağıtılarak ve ağzıları sıkıca kapandıktan sonra kuru ve serin bir yerde tutulmaları raf ömrünü kayda değer ölçüde uzatır. Bu şekilde kullanım sırasında tüm besiyeri yerine sadece daha küçük bir ambalaj açılmış olur. Daha küçük kaplara dağıtımda dehidre besiyeri aşırı toz bulutu oluşturabilir ve bunun solunması zararlıdır. Bu işlemin çeker ocak sisteminde yapılması gerekir.

Kapağı açılmamış bir dehidre besiyerinin raf ömrü genellikle 3–5 yıl kadardır. Ticari firmalar tarafından üretilen besiyeri ambalajlarında son kullanım tarihi yazmaktadır. Ancak bu tarihin, serin bir yerde depolanan ve kapağı açılmamış ambalaj ya da açıldıktan sonra doğru (serin ve kuru yerde, kutu ağzı sıkıca kapatılmış olarak) depolama yapılması koşulunda geçerli olduğu unutulmamalıdır.

Aksine ve net bir uyarı yoksa dehidre besiyerlerinin oda sıcaklığında (15–25 °C) depolanması yeterlidir. Bazı besiyerleri ambalajlarında 15 °C altında saklanması önerisine uyulması gerekir.

Dehidre besiyerlerinin buzdolabında saklanması önerilmez. Bunun nedeni buzdolabından çıkarıldıktan sonra kutu üzerindeki kondensasyon riskidir.

Bu bilgiler ışığında, dehidre besiyerlerinin otoklav, yıkama odası, su banyosu ve kaynar su banyosu yakını gibi nemin yüksek olduğu yerlerde ve doğrudan güneş ışığı alan dolaplarda depolanmaması gereği ortaya çıkar.

Burada verilen tüm bilgiler dehidre haldeki besiyeri bileşenleri için de geçerlidir. Genel olarak, anorganik bileşenler organiklere kıyasla çok daha uzun süre ile depolanabilir.

03.07.02. Çözeltilerin Depolanması

Laboratuvarda hazırlanmış çözeltilerin pek çoğu ışığa duyarlıdır ve soğukta saklanması gerekmez. Buna göre tercihen cam çözelti şişelerinde ve oda sıcaklığında depolanabilirler.

Işığa duyarlı olan çözeltilerin amber renkli şişelerde depolanması gerekir. Benzer şekilde bazı çözeltiler buz dolabında korunmalıdır.

Çözeltilerde nem kaybı olması, konsantrasyon değişikliğine neden olacağı için, bunların ağzı iyi kapatılan kaplarda depolanması gerekir. Alkol uçucu olduğu için, ağzı açık kaplarda uzun süre beklerse konsantrasyonu düşer ve buna bağlı olarak dezenfeksiyon etkisi azalır.

03.07.03. Katkıların Depolanması

Aksine bir uyarı yoksa besiyeri katkıları 2–8 °C'da depolanır. Çoğu katkı için ağzı açılmamış (ya da açıldıktan sonra sıkıca kapatılmış halde, soğuk ve kuru bir yerde) olmak kaydı ile depolama süresi 3–5 yıldır. Yumurta sarısı içeren katkılarda bu süre daha azdır.

Bazı katkılar, üzerlerine steril damıtık su ve/veya alkol eklenerek kullanıma hazır hale getirilir. Bunlardan bazılarının hazırlandıkları gün kullanılma zorunluluğu varken, bazıları bir süre depolanabilir.

Sadece antibiyotik içeren katkılar sulandırıldıktan sonra uygun küçük miktarlar halinde (örneğin steril Eppendorf tüplerinde) dondurularak saklanabilir. Bu şekilde depolanmış olan çözeltiler eritildikten sonra tekrar dondurulmamalıdır.

Katkıda dondurma kaynaklı potansiyel aktivite kaybı olup olmadığı kullanıcı tarafından kontrol edilmeli ve bu şekilde bir katkının bazal besiyerine ilave edildiği laboratuvar kayıtlarında belirtilmelidir.

03.07.04. Hazırlanmış Besiyerlerinin Depolanması

Çoğu laboratuvar, besiyerleri hazırlandıktan sonra sterilize edilir ve daha sonra kullanmak üzere depolanır. Bu uygulamaya çeşitli besiyeri katkıları da girer. Benzer şekilde kullanıma hazır halde Petri kutularında, vida kapaklı şişelerde vb. şekillerde kullanıma hazır halde besiyerleri sağlanabilmektedir.

Hazırlanmış besiyerlerinin stabilitesi sınırlıdır. Bunların depolanabilme süresi öncelikle bileşimine ve saklama koşullarına bağlıdır. Her laboratuvar, kendi hazırlama, paketleme ve saklama koşullarına göre hazırlanmış her besiyeri için depolama süresini belirlemeli, bu şekilde talimatlara geçmelidir.

ISO 11133'e göre besiyerleri katkı ilave edilmemiş olmak kaydı ile buzdolabında en çok 3 ay, oda sıcaklığında en çok 1 ay süre ile depolanabilir. Bununla birlikte, bazı besiyerlerinin hazırlandığı gün kullanılma zorunluluğu vardır. Laboratuvar personeli bu konuda çok dikkatli olmalıdır.

Hazırlanmış besiyerlerinin ne kadar süre ile depolanacağı öncelikle besiyeri bileşimine, hangi ambalajda (tüp, vida kapaklı şişe, plastik Petri kutusu, cam Petri kutusu vb.) olduğuna, depolama koşullarına bağlıdır. Genel olarak, basit bileşime sahip ve içinde katkı içermeyen besiyerleri, diğerlerine göre daha stabildir ve buna bağlı olarak daha kolay depolanabilirler.

Hazırlanmış besiyerlerinde raf ömrünü belirleyen en önemli faktörler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Işık

Hazırlanmış besiyerleri, peroksitler gibi bakterisit ve bakteriostatik bileşiklerin oluşmasını önlemek için renkli şişelerde ya da doğrudan ışık almayacak şekilde depolanmalıdır. Standart depolamada ilave bir önleme gerek yoktur. Rose Bengal gibi bazı bileşenler ışığa aşırı duyarlıdır. Dolayısı ile bu bileşeni içeren hazırlanmış bir besiyerinin bulunduğu Petri kutularının (bakınız; 47.01. ve 47.08. Bölüm) mutfak tipi alüminyum folyo ile sarılarak depolanması (hatta inkübasyonu) önerilir.

Nem

Dehidre besiyerinin nem alması ne denli istenmiyor ise hazırlanmış besiyerlerinde nem kaybından da o denli kaçınmak gerekir. Tüplerde, erlen ve balonlarda hazırlanmış besiyerlerinde nem kaybının önlenmesi kolaydır. Bu tip cam malzemede kap ağzının parafilm veya mutfak tipi strech film ile sarılması nem kaybını önemli ölçüde önler.

Petri kutularında nem kaybını önlemek daha güçtür. Standart laboratuvar tüpünde hazırlanmış Nutrient Agar besiyeri ile sterilizasyondan sonra Petri kutularına dökülmüş Nutrient Agar arasında yüzey/hacim oranı farklılığından kaynaklanan bir nem kaybı farklılığı vardır. Kuşkusuz, Petri kutusundaki besiyerinde nem kaybı tüptekinden çok daha fazla olacaktır.

Basit bir örnek olarak, depolama başlangıcında 5 mm olan agarlı besiyeri kalınlığı depolama sürecinde 4 mm'ye inerse, bu durum çok yaklaşık olarak %20 nem kaybının göstergesidir. Besiyerinde ozmotik değişimler olması yanında, özellikle selektif besiyerlerinde selektivite veren bileşenlerin %20 konsantrasyon artışı pek çok sahte negatif sonuca yol açar. Ayrıca kuruma yüzey ve yüzeye yakın yerlerde çok daha fazla olur. Agarlı besiyerinde depolama sırasında (dara hariç olmak üzere) %15 ağırlık kaybı izin verilen sınırdır (bakınız; 06.02. Bölüm). Gram negatif bakteriler besiyerindeki kurumaya bağlı olumsuzluklardan daha fazla etkilenir.

Petri kutularına dökülerek depolanacak agarlı besiyerlerinde nem kaybının önüne geçilmesi için, Petri kutularını vakum altında depolamak önerilebilir.

Bu konuda da yine ev mutfaklarında çeşitli gıdaların vakum altında tutulması için üretilmiş basit makinelerden ve bunların özel torbalarından yararlanılabilir. Bu olanak yoksa, Petri kutularının mutfak tipi stretch film ile sarılarak depolanması basit, ancak raf ömrünü kayda değer ölçüde uzatan bir uygulamadır.

Genel olarak plastik Petri kutularında, kapakların tam olarak kapanmasına bağlı olarak cam olanlara göre daha az nem kaybı olur.

Depolanacak Petri kutularında yüzey kurutması yapılmamalıdır. Eğer kullanım öncesinde yüzeyde bir ıslaklık görülürse, kurutma bu aşamada yapılmalıdır.

Sıcaklık

Hazırlanmış besiyerleri elden geldiği ölçüde serin ortamlarda tutulmalıdır. Ancak, özellikle agarlı besiyerlerinin dondurulmasından kesinlikle kaçınılması gerekir. Dondurma, agarın jelleşme özelliğine önemli ölçüde zarar verir.

Bileşimi bağlı olmak üzere hazırlanmış besiyerleri için değişik depolama sıcaklıkları önerilmektedir. Hazırlanmış besiyerlerinin standart buzdolaplarının çok soğuk olmayan orta ve alt bölmelerinde depolanması yaygın ve doğru bir uygulamadır. Aksine bir uyarı yoksa genel olarak hazırlanmış besiyerleri 4–12 °C'da karanlık ve nem kaybetmeyecek şekilde depolanmalıdır. Kan, yumurta sarısı, yumurta sarısı–tellurit emülsiyonu ve antibiyotik ilave edilmiş besiyerleri ise 2–8 °C'da depolanmalıdır. Rambach Agar gibi bazı besiyerleri için en düşük depolama sıcaklığı 6 °C'dır. Fraser Broth gibi bazı besiyerlerinde katkı ilave edildiği gün kullanılması gerektiği unutulmamalıdır.

03.08. Çözeltilerin Hazırlanması

Mikrobiyoloji laboratuvarında en çok kullanılan çözeltiler seyreltme amaçlı olanlardır. Bunlar genel olarak, 90 ve 9 mL hacimde hazırlanır. Çiğ süt örneklerinde doğrudan 100 misli seyreltme için bu çözeltiler 99 mL olarak da hazırlanabilir. 99 mL olarak hazırlanan çözeltiler istenirse 1 mL ilavesi ile 1:100, istenirse 11 mL ilavesi ile 1:10 seyreltme için kullanılabilir.

90 (ya da 99) mL olarak hazırlanan dilüsyon şişesindeki (erlendeki) sıvı hacmi sterilizasyondan sonra oda sıcaklığında kontrol edilir. Bu amaçla her 25 şişeden biri "A sınıfı" dereceli silindir ya da eşdeğeri ile kontrol edilir.

İzin verilen sapma hacmi $\pm 0.2\%$ 'dir. Daha fazla sapma olursa, nedeni araştırılıp, düzeltici uygulama yapılmalı ve kayda geçilmelidir. Hacim değişikliklerinin temel nedenleri arasında otoklavın yanlış kullanılması da vardır.

Laboratuvarlarda hazırlanarak kullanılan diğer çözeltiler arasında alkol, asitler ve bazlar ile boyalar vardır. Alkol, dezenfektan olarak %76 (v/v) konsantrasyonda kullanılır. Genellikle %96 konsantrasyonda pazarlanır. Buna göre, 4 hacim alkol üzerine 1 hacim damıtık su eklendiğinde çok yaklaşık olarak bu değer elde edilir.

Derişik çözeltilerden daha seyreltik olanların hazırlanmasında, Pearson karesi ile hesaplama yapılır. Pearson karesi; % (dolayısı ile ppm gibi) ifade edilen çözeltiler için kullanılır. Aşağıda basit bir örnekle derişik olandan daha seyreltiğın hazırlanması verilmiştir:

-%96'lık alkolden damıtık su ile %76'lık alkol hazırlanması için sol üst köşeye 96, sol alt köşeye 0 (sudaki alkol konsantrasyonu) karenin merkezine 76 (hedeflenen konsantrasyon) yazılır. Köşegenler boyunca fark alınarak elde edilen değer diğer köşelere yazılır. Buna göre $96 - 76 = 20$ sağ alt köşeye, $76 - 0 = 76$ sağ üst köşeye yazılarak kare tamamlanır. Sonra karenin alt ve üst kenarları boyunca okuma yapılır: %96 konsantrasyondaki alkolden 76 kısım ve %0 konsantrasyonlu alkolden (damıtık su) 20 kısım karıştırıldığında %76'lık alkol elde edilir.

96		76	$\Rightarrow$ %96'lık alkolden 76 hacim
	76		
0		20	$\Rightarrow$ %0'lık alkolden 20 hacim

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında pH ayarlamak amacıyla genellikle 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılır. "Normal" çözeltilerin hazırlanmasında önce molekül ağırlığı hesaplanır. Molekül ağırlığı, bileşikteki atom ağırlıkları toplamıdır.

NaOH için molekül (mol) ağırlığı; Na: 23; O: 16; H: 1 olmak üzere 40'tır.

1 litre damıtık su içinde 40 g NaOH çözülmesi ile elde edilen çözelti 1 Molar (M) olarak tanımlanır. Molekül ağırlığının tesir değerine bölünmesi ve çıkan değerın 1 litre suda çözülmesi ile 1 Normal (N) çözelti elde edilir. NaOH için tesir (etki) değeri: 1 olduğuna göre 40 g/L çözelti aynı zamanda 1 Normaldir.

Yukarıda besiyerlerinin formülünden hazırlanması bölümünde örneğı verilmiş olan $MgSO_4$ 'ın mol ağırlığı 108 gram ve tesir değeri 2'dir. Buna göre 108 g/L çözelti 1 M, 54 g/L çözelti 1 N'dir.

Asitlerden yapılan hesaplamalarda derişim de dikkate alınır. Örneğın, 1 N (1 M) HCl hazırlamak için son konsantrasyon 36,5 g/L olacak şekilde damıtık su üzerine asit ilave edilir (hiçbir koşulda asit üzerine su ilave edilmez). Burada dikkat edilecek konu HCl'in, NaOH gibi katı ve saf olmadığıdır.

Buna göre, standart derişik (%38) HCl asitten 80,1 mL alınıp, en az 0,5 litre damıtık suya ilave edilir ve sonra damıtık su ile litreye tamamlanır. Bu şekilde hazırlanmış çözeltide 36,5 g/L saf HCl bulunur.

Çözeltinin hazırlandığı tarih, bileşimi ve gerekli görülen diğer bilgiler şişe üzerinde açıkça belirtilmeli, etiket üzerindeki yazıların silinmemesi sağlanmalıdır.

Sterilize edilmiş çözeltilerin kontamine edilmemesine özen gösterilmeli, kuşku duyulursa bu çözelti asla kullanılmamalıdır.

Çözeltiler konusunda ayrıntılı bilgi www.kimyaevi.org sitesinden sağlanabilir.

03.09. Besiyeri Kalite Kontrolü

Besiyeri üreten firmalar, ürettikleri ve pazarladıkları dehidre besiyerleri, hazır besiyerleri ve katkılarını sistematik olarak kalite kontrolden geçirmektedirler. ISO 11133 sayılı standart üretici firmanın yükümlülüklerini belirlemektedir.

Dehidre besiyerleri, bileşenleri ve katkılarını kullananlar için ilave kontrol uygulamalarına genellikle gerek duyulmaz. Buna karşın, -özellikle kuşku duyulmayı gerektirecek bir durumla karşılaşıldığında- aşağıdaki kontrollerin kullanıcılar tarafından yapılması yararlı olacaktır:

-Önce, orijinal ambalajın fiziksel olarak zarar görmemiş olduğu kontrol edilir. Kapak açıldıktan sonra renkte anormallik, topaklaşma gibi kontroller yapılır.

-Laboratuvarda sık kullanılan dehidre besiyerleri için, halen kullanılmakta olan kutudan son parti besiyeri hazırlanırken yeni kutunun açılması, bu kutudan da yeteri miktarda besiyeri hazırlanması, ekimlerin her iki grup besiyerinde beraberce (paralel) yapılması ile bir anlamda yeni kutu için kalite kontrol yapılmış olur. Her iki grupta, istatistik olarak analiz yapılmak üzere birbirlerinden farksız sonuç alınması gerekir.

-Aynı uygulama besiyeri katkıları için de yapılmalıdır.

-Besiyeri üreten firmalar tarafından hazırlanan kataloglarda hangi besiyerinde hangi mikroorganizmaların nasıl gelişeceği "kalite kontrol mikroorganizmaları" adı altında gösterilir. Bu mikroorganizmaları besiyeri üreten ve/veya pazarlayan firmalardan sağlamanın maliyeti çok yüksek olabilir. Laboratuvarda sürekli analizi yapılan mikroorganizmaların basit bir koleksiyonu ve otokontrol içerikli çalışmalar 09. Bölümde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

-Besiyerinde kullanıcı tarafından çözülemeyen bir hata kaynağı varsa, öncelikle besiyerini pazarlayan firmayla temas kurulmalıdır.

03.10. Besiyeri Hataları

Besiyerlerinde, doğrudan analiz sonucuna yansiyabilecek çeşitli hatalar ile bunların olası nedenleri aşağıda listelenmiştir. Görüleceği gibi; nem almış, yanlış tartılmış, aşırı ısıtılmış, hazırlamasında damıtık su kullanılmamış besiyerlerinde pek çok hata görülmektedir. Bu gibi hatalar gösteren ya da hatalı olduğundan yana kuşku duyulan besiyerleri mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

-Dehidre besiyerinde topaklaşma: Depolamada aşırı nem, dehidre besiyeri kutu kapağının nemli bir ortamda uzun süre açık kalması ve/veya gevşek kapatılmış olması, besiyerinin çok eski olması.

-Yanlış pH: Nötral olmayan su kullanımı, aşırı ısıtma, dehidre besiyerinin çok eski olması, yanlış tartım, pH'nın yanlış sıcaklıkta ölçülmesi, pH metre kalibrasyon hatası, sulandırmadan sonra sterilizasyonun zamanında yapılmaması, yetersiz yıkanmış cam malzeme kullanılması, dehidre besiyerinin nem alması.

-Anormal renk: Saf olmayan su kullanımı, kirli cam malzeme, yanlış pH, aşırı ısıtma, hatalı tartım, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Besiyerinde kararma: Aşırı ısıtma, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Bulanıklık ve presipitasyon: Saf olmayan suyun kullanılması, temiz olmayan cam malzemenin kullanılması, hatalı pH, aşırı ısıtma, bileşimden hazırlanmış besiyerlerinde temel bileşen(ler)'in yeterli saflıkta olmaması, hazırlanmış besiyerinde depolama sırasında nem kaybı, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Yüksek jelleşme sıcaklığı: Hatalı tartım, uygun olmayan agar kullanılması.

-Zayıf jelleşme stabilitesi: Hatalı tartım, dehidre besiyerinin tam çözülmeden dağıtılmış olması, düşük pH, asidin besiyeri çok sıcakken ilave edilmesi, aşırı ısıtma, erimiş halde uzun süre ile su banyosunda bekletme.

-Zayıf gelişme: Yetersiz yıkanmış ve/veya durulanmamış cam malzemeden inhibitör madde kontaminasyonu, hatalı pH, besiyeri ve katkılarının hatalı tartımı ve/veya hatalı ilavesi, aşırı ısıtma, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Aşırı gelişme: Selektif inhibitörlerin bozulacağı kadar aşırı ısıtma veya selektif katkıların yüksek sıcaklıkta bazal besiyerine ilavesi, selektif inhibitörlerin eksik tartımı/ilavesi, inhibitör içeren besiyerlerinde standart dışı uzun süre depolama.

-Kolonilerin yayılması: Besiyeri yüzeyinin çok ıslak olması, selektif inhibitörlerin bozulacağı kadar yüksek sıcaklıkta katkı ilavesi.

-Atipik gelişme: Besiyerinin hatalı hazırlanması, dehidre besiyerinin çok eski olması, hazırlanmış besiyerinin uygun olmayan koşullarda ve/veya uzun süreli depolanması, cam malzeme ve/veya sudan çeşitli inhibitörler ve/veya yabancı maddelerin kontaminasyonu.

03.11. Tehlikeli Maddeler

Dehidre besiyerleri safra tuzları, asit, selenit, boyalar vb. zehirli maddeler ile toz gibi zararlı maddeler içerir. Toz besiyerleri kullanıldığında tartım sırasında yayılan tozu solumamak için önlem alınması önerilir. Tehlikeli maddeler başlıca; soluma, deri ile temas, göz ile temas ve yutma yolu ile çalışanlar için potansiyel hastalıklar oluşturur. Bunların bir kısmı vücuda kontamine olduğu anda etkisini gösterir, bir kısmının etkisi çok uzun süre sonra görülür.

Ayrıca, bazı besiyeri bileşenlerinin çevre açısından kirlilik oluşturduğu da dikkate alınmalı, buna göre besiyeri ve bileşenlerinin çöpe atılmasında gereken özen gösterilmelidir.

Bazı besiyerlerinin bileşiminde insan sağlığı açısından tehlikeli maddeler bulunur. Bu maddelerden bir kısmı sadece bu maddelere duyarlı kişiler için önemli iken, talyum gibi bazı kimyasallar ile çalışılırken özel önlem alınması gerekir. Aşağıda insan sağlığı için tehlikeli olan kimyasallara örnekler verilmiştir:

-Barbitone: "Narkotik" grupta değerlendirilir. Bileşimden hazırlanan bazı besiyerlerinde kullanılır.

-Bile salts (safra tuzları): Mukoz membranları tahriş eder. Koliform grup bakteriler için kullanılan bazı besiyerlerinde bulunur.

-Brilliant green: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Koliform grup bakteriler için kullanılan bazı besiyerlerinde bulunur.

-Cetrimide: Yutulması zararlıdır, göz ve deride tahriş yapar. Başta Cetrimide Agar olmak üzere Gram pozitif bakterilerin inhibisyonu için bazı *Pseudomonas* besiyerlerinde bulunur.

-Chloramphenicol: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Genel bakteri inhibitörü olarak DRBC ve RBC gibi bazı maya-küf besiyerleri bileşimindedir.

-Crystal violet: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Gram pozitiflerin inhibisyonu için başta VRB Agar olmak üzere bazı koliform grup bakteri besiyerleri bileşiminde bulunur.

-Cycloheximide: Selektif katkı olarak bulunduğu konsantrasyonu tehlikelidir. Ancak besiyerine ilave edildiğinde konsantrasyon, tehlikeli olabilecek düzeyin altına iner. Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Listeria* besiyerlerinin bazılarında bulunur. Bu selektif katkı ile çalışılırken dikkatli olunması gerekir.

-Deoxycholate: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Salmonella* ve koliform grup bakteriler için hazırlanmış bazı besiyerlerinin bünyesinde bulunur.

-Kanamycin: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Fekal streptokoklar ve *Cl. perfringens* için hazırlanmış bazı besiyerlerinin bünyesinde bulunur.

-Lithium choride: Yutulması zararlıdır, kusma ve ishale neden olur. Solunum sisteminde mukoza irritasyonu ile öksürüğe, deride tahrişe, göze bulaşması halinde irritasyona yol açar. Toksik doz, görme bozukluğu ve kalp ritim bozukluğuna neden olur. Baird–Parker Agar ve Fraser Broth gibi bazı besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

-Malachite green: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Gram pozitifleri inhibe eder. Özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella* için hazırlanmış RVS Broth gibi bazı besiyerlerinin bileşiminde bulunur.

-Nalidixic acid: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Pseudomonas aeruginosa* ve Fraser Broth gibi bazı *Listeria* besiyerlerinin bileşiminde bulunur.

-Potassium tellurite: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Staphylococcus* için hazırlanan besiyerlerinin çoğunda, *E. coli* O157:H7 için kullanılan CT–SMAC Agar besiyeri katkısında bulunur. Nutrient Broth'a %0,05 oranında katılarak *Listeria monocytogenes* zenginleştirmesinde kullanılabilir.

-Sodium azide: Dehidre besiyerlerinde az miktarda bulunmakla beraber, bazı kişilerde aşırı duyarlılık görülebilir. Sodium azide, başta bakır olmak üzere metaller ile temas ettiğinde patlayıcı metal azitleri oluşturur. Bu nedenle sodium azide içeren besiyerleri yıkama sırasında önce bol su ile muamele edilmelidir. Bunların dışında, sodium azide asitlerle temas ettiğinde toksik gaz oluşturur. Enterokoklar için hazırlanan besiyerlerinin bazılarında bulunur. %1'den yüksek konsantrasyonlar ile çalışılırken gereken önlem alınmalıdır (örneğin, çeker ocak).

-Sodium selenite: Solunması ile bronşiyal spazmlara, boğulma ve zatürre semptomlarına yol açar. Sindirilmesiyle bulantı, solgunluk ve mide şikayetleri oluşur. Karaciğer, böbrekler ve merkezi sinir sistemine zarar verir, alerjik reaksiyonlara neden olabilir. Çözeltisi deri ve gözde tahriş yapar. Kümülatif etki riski vardır. Teratojenik potansiyeli olduğundan doğurgan yaşta kadınlar bu madde ile çalışmaları sırasında çok dikkatli olmalıdır. Selenite Cystine Broth gibi bazı *Salmonella* besiyerlerinde yer alır.

-Sodium metabisulphite: Asit ile temasında toksik bir gaz olan sodium dioxide oluşur; bu gaz solunum sistemi ve deriyi tahriş eder. *Campylobacter* analizinde kullanılan Bolton Selective Enrichment Broth (Base) bileşiminde bulunur.

-Sodium thioglycollate: Solunması ve yutulması toksik etki yapar, deriyi tahriş eder. Anaeroblar için kullanılan bazı besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

-Thallium salts (talyum tuzları): Solunması veya sindirilmesi toksik etki yapar. Kümülatif etki riski vardır. Bileşimden hazırlanan bazı besiyerlerinde bulunur.

04. Sterilizasyon*

04.01. Genel Bilgiler	57
04.02. Nemli Sıcak Uygulaması	59
04.02.01. Otoklavda Sterilizasyon	60
04.02.02. Kaynatarak–Isıtarak Sterilizasyon	64
04.02.03. Tindelizasyon	65
04.03. Kuru Sıcak Uygulaması	65
04.04. Membran Filtrasyon	66
04.05. Kimyasal Madde ile Sterilizasyon	66
04.06. Işınlama ile Sterilizasyon	68
04.07. Sterilizasyon Kontrolü	69
04.08. Sterilize Edilmeyen Çözeltiler	70
04.09. D ve Z Değerleri	70

04.01. Genel Bilgiler

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında elde edilen sonuçların güvenilir olması için belirli çalışma kurallarına eksiksiz uyulması gerekir. Bunların en önemlilerinden birisi de, kullanılan malzemenin steril olmasıdır.

Besiyerleri, besiyeri katkıları, çözeltiler, cam malzeme, blender gövdesi vb. malzeme steril olmazsa; bunlardan gelebilecek mikroorganizmalar, gıdadan gelmiş gibi değerlendirilir. Örneğin, analiz edilen gıdada *E. coli* yok, fakat bir önceki analizde kullanılan pipette *E. coli* kalmışsa, analiz sonunda "*E. coli* var." şeklinde sahte pozitif sonuç içeren bir rapor verilecektir.

Standart gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında, besiyerleri çok büyük çoğunlukla farklı normlarda olmak üzere otoklavda ya da basitçe kaynatarak, bazen de membran filtrasyonla, cam malzeme ise etüvde kuru sıcak uygulamasıyla sterilize edilir.

Sterilizasyon bir kavram olarak "belirli bir ortamı tüm mikroorganizmalarından arındırmak" olarak tanımlanır. Buna göre; mikroorganizmaları öldürmek şart değildir, membran filtrasyon sadece fiziksel bir ayırmadır.

Dezenfeksiyon ise, çok basit bir tanımlama ve çoğunlukla kimyasal madde kullanımı ile özdeş olmak üzere, "yüzeylerin her türlü hastalık yapıcı etkenlerden yani mikroorganizmalardan arındırılması (öldürmek veya güvenilir seviyelere indirmek) için uygulanan kimyasal işlemler" olarak nitelenmektedir.

* Bu bölüm, Prof. Dr. A. Kadir Halkman tarafından yazılmıştır.

Bununla birlikte; gıda mikrobiyolojisinde sadece hastalık yapıcı etmenler değil, saprofitler de ele alınır. Buna göre, analiz edilecek örnek ambalajının dış yüzünün alkol ya da amaca uygun başka bir kimyasal ile silinerek her türlü mikroorganizma varlığından arındırmak sterilizasyon olsa da, uygulama olarak dezenfeksiyondur.

Benzer kavram karmaşaları pastörizasyon ve ticari sterilizasyonda da vardır.

Pastörizasyon, 100 °C altındaki ısı işlemi tanımlar. Buna göre, otoklav (basınç) kullanılmadan yapılan nemli sıcak uygulaması pastörizasyondur. İçme sütü ve meyve suyu için yaklaşık olarak aynı ısı işlem uygulanmakla birlikte; pastörize içme sütünün raf ömrü, soğukta depolamak kaydı ile sadece 1 hafta kadar iken, meyve suyu steril kabul edilir ve oda sıcaklığında aylarca depolanabilir. Bu 2 gıda arasındaki temel fark asitliktir. Bu kavram, aşağıda ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

Bu aşamada ticari sterilizasyon tanımı üzerinde de durulmalıdır.

UHT sütün ya da bezelye konservesinin birim ambalajında yetersiz ısı işlem nedeni ile sadece bir tek canlı bakteri sporu bile bulunursa, hızla vejetatif hale geçer ve sonra çoğalarak ürünü bozar.

Oysa, meyve suyu ve konsantresi ile salça gibi asitli ürünlerde, yetersiz ısı işlem sonucunda canlı kalan bakteri sporları, ortamdaki yüksek asitlik nedeni ile kolaylıkla vejetatif hale geçip, çoğalamaz ya da bu işlem süt, sebze konservesi gibi nötral ürünlere oranla çok daha uzun sürede gerçekleşir. Buna karşın, standart mikrobiyolojik analizlerde besiyerine geçen bu sporlar, asitlik gibi olumsuz koşullardan kurtuldukları için hızla germine olup, koloni oluşturur.

Buna göre, standart mikrobiyolojik analizlerde saptanan bu mikroorganizmaların üründe de gelişerek mutlaka bozulma yapacağı anlamı çıkarılmamalıdır.

Asidik ürünlere uygulanan ısı işlem, bu nedenle "ticari sterilizasyon" adını alır. Bir başka deyiş ile, bu gibi ürünler UHT içme sütünde olduğu gibi mutlak steril olmak zorunda değildir, ancak ticari anlamda steril kabul edilir. Bu ürünlerde canlı kalmış olan bakteri sporları genellikle sorun çıkarmaz. Uygulanan ısı işlem "gelişerek bozulma yapma potansiyeline sahip mikroorganizmaların tahribi için yeterlidir". Bu işlem sırasında patojenlerin tümü öldürülür.

Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin sterilizasyonunda da benzer ilkelerden yararlanılır. VRB Agar besiyeri sadece kaynatılarak "sterilize" edilir. Burada amaç sadece besiyeri, su, kullanılan cam malzeme, tartım kayıkçığı, spatül vb. materyalden gelebilecek Enterobacteriaceae familyası üyelerinin öldürülmesine yöneliktir. Sporsuz tüm bakteriler, sporlu ya da vejetatif haldeki maya ve küfler uygulanan bu ısı işlem ile ölür.

Besiyerinde canlı olarak kalmış olan sporlu bakterilerin besiyeri bileşimindeki çeşitli inhibitörler nedeni ile vejetatif hale geçip, koliform bakterilere benzer ya da benzemez koloni oluşturma olasılığı standart analiz süresi olan 48 saat içinde mümkün değildir.

Tersine, Plate Count Agar, CASO Broth, yarı katı Nutrient Agar gibi genel besiyerlerinin mutlak steril olması gereklidir.

VRB Agar örneğinde, uygulanan ısıtma işlemi Enterobacteriaceae familyası üyesi bakterilerin öldürülmesine değil, agarın eritilmesine göre ayarlanmıştır. Bu amaç için uygulanan ısıtma işlemi, Enterobacteriaceae familyası üyesi bakteriler zaten öldürülür. VRB Agar yanında, Rambach Agar vb. pek çok besiyerinde selektiviteye bağlı olarak, sadece agarın eritilmesi için uygulanan ısıtma işlemi, bu besiyerinde standart inkübasyon süresi içinde olmak kaydı ile gelişebilecek tüm mikroorganizmaların tahribi için yeterlidir.

Salmonella analizinde kullanılan Selenite Cystine Broth hazırlanmasında uygulanan ısıtma işlemi "sadece 60 °C'a kadar ısıtmak" şeklindedir ve bu norm doğrudan bu besiyerinde gelişebilecek olan Enterobacteriaceae familyası üyelerini öldürmek içindir.

Genel olarak mikrobiyolojide sterilizasyon denildiğinde, ısıtma işlemi (nemli ve kuru sıcak), membran filtrasyon, kimyasal madde ile sterilizasyon ve ışınlama ile sterilizasyon yöntemleri anlaşılmaktadır. Bunlardan kimyasal madde uygulaması ve kuru hava sterilizasyonu, besiyerlerine ve çözeltilere uygun değildir. Işınlama ise pratik olarak uygulanacak bir yöntem değildir, sadece özel amaçlı dehidre besiyeri üretiminde kullanılır.

Aşağıda, besiyerleri ve çözeltilerin sterilizasyonunda en yoğun kullanılan nemli sıcak uygulaması hakkında ayrıntılı bilgi verilmiş, diğer sterilizasyon yöntemlerine kısaca değinilmiştir.

04.02. Nemli Sıcak Uygulaması

Nemli sıcak uygulamasının kuru sıcak uygulamasına göre daha etkili olduğu, mikrobiyolojinin ilk gelişme dönemi olan R. Koch zamanından beri bilinmektedir. Yüksek sıcaklıktaki ısıtma işleminin mikroorganizmaları öldürdüğü açıktır. Burada nemli ve kuru sıcak uygulaması arasındaki fark, sadece ısı enerjisinin iletilmesidir. Su buharı, ısı enerjisini kuru havaya göre çok daha iyi bir şekilde iletmediği için sterilizasyonda çok daha etkilidir. Buna göre sterilizasyon etkisi, nemli sıcak uygulamasında 121 °C'da 15 dakikada, kuru hava sterilizasyonunda ise ancak 170 °C'da 2 saat içinde sağlanmaktadır.

04.02.01. Otoklavda Sterilizasyon

Isıl işlem, özel olarak aksine bir uyarı yoksa, otoklavda ve 121 °C'da yapılır. Uygulama süresi çoğunlukla 15–20 dakika olarak verilir. Bazı kaynaklarda, ısıtıl işlem normu sıcaklık ile değil, basınçla gösterilir. Aşağıda basit bir sıcaklık–basınç dönüşüm çizelgesi verilmiştir.

Çizelge 04. Sıcaklık–Basınç Dönüşümü

Sıcaklık		Basınç		Sıcaklık		Basınç	
°C	°F	kg/cm ²	psi*	°C	°F	kg/cm ²	psi*
100	212	0,00	0,0	121	250	1,02	15,0
105	221	0,19	2,8	125	257	1,29	19,0
110	230	0,41	6,0	130	266	1,67	24,5
115	239	0,67	9,8	134	273	2,00	29,4

* psi: pound per square inch; inç kareye pound (libre) olarak basınç.

Sterilizasyonun amacı, dehidre besiyeri, besiyeri katkıları, cam malzeme, tartım ekipmanı, su, pamuk vb. materyalden gelebilecek mikroorganizmaların tümünü öldürmektir. Böylece besiyerinde gelişen mikroorganizma, çalışma özelliğine göre örnekten/ana kültürden gelmiş olacaktır. Bu mantık altında besiyerinin sterilize edilmesi için elden geldiği ölçüde yüksek sıcaklık ve uzun süre uygulanması gerekir. Ancak, 50 °C üzerindeki sıcaklıklarda besin maddeleri ve agarın jelleşme özelliği olumsuz etkilenir. Bu olumsuzluk, çeşitli kontrol çalışmalarında sahte negatif sonuçların alınmasına yol açabilir.

Bu açıdan bakıldığında da elden geldiği ölçüde düşük sıcaklık ve kısa süre uygulaması bir anlamda zorunluluktur. Kuşkusuz, bu koşulda sterilizasyon sağlanamaz ve kontrol amaçlı çalışmalarda sahte pozitif sonuçlar alınır. Bu çerçevede, besiyerinin içinde bulunabilecek tüm mikroorganizmaları öldürmek, ancak besiyerine en az zarar verecek bir ısıtıl işlem normunun seçilmesi gerekir. Bu norm, 121 °C'da 15–20 dakika olarak ortaya çıkar.

Isıl işlem normunu öncelikle sterilize edilecek besiyerinin hacmi, besiyerinde agar olup olmaması ve cam malzemenin cinsi etkiler.

Genel bir yaklaşım ile, 15 dakikalık ısıtıl işlem süresi standart test tüplerinden, 250 mL hacme kadar geçerlidir. 500 mL hacim için 20 dakika, 1 litre hacim için 25 dakika süre kullanılmalıdır.

Prensip olarak, aksine ve özel olarak belirtilmemiş ise, 1 litre hacim otoklavda sterilizasyon için üst sınırdır. Günlük uygulama için önerilen şekil 500 mL erlende 250 mL besiyeridir.

Yapılan bir araştırmada aynı et kalınlığına sahip cam kaplar kullanılmış ve besiyeri sıcaklığının otoklavda 121 °C'a çıkma süresi 500 mL için 18 dakika, 1 litre için 22 dakika, 2 litre için 27 dakika ve 5 litre için 37 dakika olarak bulunmuştur. Bu durumda, 5 litrelik bir kaptaki sterilizasyon yapılırken otoklav sıcaklığı 121 °C'a çıktığında sadece 15 dakika beklenirse, besiyeri sıcaklığı soğuk noktada henüz 121 °C'a ulaşmamış olacaktır.

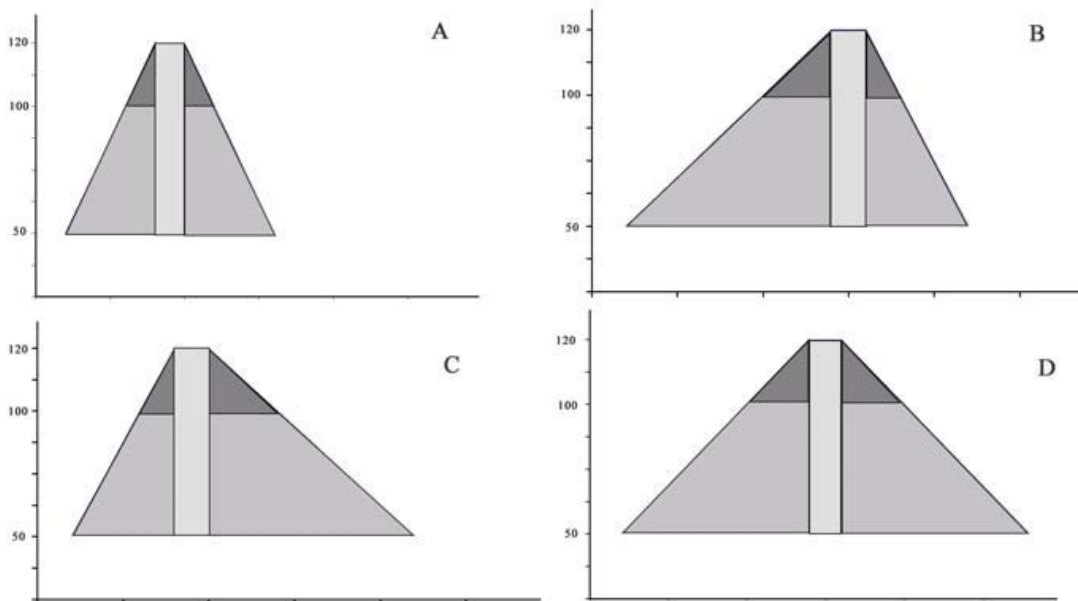
Bir diğer deyiş ile otoklav içi sıcaklık ile otoklavdaki besiyeri sıcaklığı aynı değildir ve otoklav sıcaklığı olarak ölçülen değer otoklavdaki atmosferin sıcaklığını göstermektedir.

Besiyeri bileşiminde agar varsa, ısı iletimi agarsız olanlara göre daha yavaş olacaktır. Agar ısıyı zayıf ileten bir bileşiktir. Dolayısı ile agarlı besiyeri, hacimle ilişkili olarak agarsızlara göre 2-5-10 dakika gibi daha uzun süre ile sterilize edilmelidir. Yapılan bir araştırmada, ince çeperli bir kaptaki 500 mL agarlı besiyerinin, aynı hacimde normal çeperli bir kaptaki saf suya göre 121 °C'a 6 dakika daha geç ulaştığı belirlenmiştir.

Besiyerinin sterilize edileceği cam kabın et kalınlığı ısı iletiminde önemli bir faktördür. Doğal olarak ince et kalınlığına sahip standart erlen ve balonlar ısıyı normal bir şekilde iletirken, kalın et duvarlı özel şişelerde ilave sterilizasyon sürelerine gerek duyulur.

Otoklavda sterilizasyonda dikkate alınması gereken en önemli ayrıntı, "toplam ısı girişi" kavramıdır. Bu kavram, 50 °C üzerindeki sıcaklık/süre alanıdır. şekil 06'daki 4 farklı otoklavlama örneğinde toplam ısı girişi gösterilmiştir.

şekil 06. Toplam Isı Girişi.



Şekil (a) normal bir otoklavda, şekil (b) arızalı olduğu için geç ısınan bir otoklavda, şekil (c) -örneğin öğle saatine geldiği için- sterilizasyon sonrası kapalı bırakılan normal çalışan bir otoklavda ve şekil (d) ise hem arızalı olduğu için geç ısınan hem de sterilizasyon sonrası kapalı bırakılan bir otoklavda 50 °C üzerindeki toplam ısı girişini belirten alanları göstermektedir.

121 °C'da 15 dakika olarak verilen ısı işlem normu, normal olarak çalışan ve çabuk ısıtılıp çabuk soğuyan bir otoklav için verilen toplam ısı girişini belirtmektedir.

Şekilden görüldüğü gibi, 121 °C'da tutma süresi her 4 koşulda da 15 dakika olmakla birlikte, toplam ısı girişi olarak gösterilen taralı alanlar, standart "a" otoklavı dışındakilerde daha fazladır ve diğer 3 koşulda besiyeri gereğinden fazla olarak otoklavda tutulmuştur.

Doğru çalışan bir otoklav, hava çıkışı tamamlanıp, basınç uygulamaya başlanmasından 15 dakika (tercihen 5 dakika) içinde 120±1 °C'a erişmelidir. Sterilizasyon tamamlandıktan sonra buhar çıkışının çok az açılarak basıncın kademeli olarak azaltılması zorunludur.

Basınç çok hızlı olarak düşerse otoklav içindeki besiyeri ve çözeltiler kaynar ve kap dışına taşar. Agarlı besiyerinin otoklav içine dökülmesi ciddi arızalara neden olabilir. Bazı modellerde soğutma otomatik olarak yapılır. İdeal olarak, otoklavda kalma süresi toplam 1 saattir.

Burada 121 °C'a gelinceye kadar ve 15 dakika bekleme süresinden sonraki soğuma sürecindeki ısı girişi hesaba katılmamaktadır. Oysa, bunlar dikkate alındığında sterilizasyon etkisinin çok daha yüksek olacağı görülür. Örneğin, 118 °C'da 1 dakika ile 121 °C'da 0,35 dakika tutmanın öldürücü ısı işlem etkisi eşdeğerdir.

Besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılacak otoklavlar farklı şekillerde olabilir. En basit otoklavlar ev tipi düdüklü tencere benzeri olup, bunlara sıcaklık ve basınç göstergeleri eklenmiştir. Standart otoklavlar yatık ve dik tiplerde olabilir.

Otoklavda sterilizasyonun esası, havanın su buharı ile yer değiştirmesi ve böylece buhar aracılığı ile ısı aktarımının daha kolay yapılmasıdır. Buna göre, otoklavda önce havanın tam olarak çıkması sağlanmalı, sonra basınç artırılmalıdır.

Hava tam çıkmadan basınç uygulanmaya başlanırsa, yer yer kalacak hava paketlerinde sıcaklık istenilen düzeye çıkamaz. Otoklavın aşırı doldurulması, tüplerin cam beher içinde otoklava konulması, vida kapaklı şişelerin ağzının sıkılarak ve tüp ile erlenlerin pamuk ya da tıkaçlarının sıkı olarak otoklava yerleştirilmesi, hava paketlerine neden olur ve sterilizasyon sağlanamaz.

Koliform grup bakteri analizinde kullanılan besiyerlerindeki standart boy Durham tüplerinde, otoklav sonrası hava kalması bir anlamda sterilizasyon yetersizliğinin göstergesidir. Standart bir sterilizasyonda Durham tüplerindeki hava kendiliğinden çıkar. Bu durum, büyük çoğunlukla tüplerin beher ya da benzeri kaplar içinde otoklavlanması sonucunda görülür.

Vida kapaklı şişeler aynı nedenle gevşek olarak kapatılıp otoklavlanır ve işlem sonunda otoklav açıldığında kapaklar sıkılır. Eğer besiyeri çok sıcak iken kapaklar sıkılırsa vakum oluşur ve şişe açılırken dışarıdan hava emmeye bağlı olarak kontaminasyon oluşabilir. Bu nedenle vidalı kapaklar, besiyerinin sıcaklığı yaklaşık 50 °C'a soğuduğu zaman sıkıştırılır.

Otoklavlama sırasında basınç artırılmaya başlanıncaya kadar, buharlaşmaya bağlı olarak besiyerinde hacim azalması olur. Otoklav cinsi, uygulanan işlem gibi nedenlere bağlı olarak hacim azalması %5'ten fazla ise, kaybolan hacim kadar steril saf su eklenir. Seyreltme çözeltilerinde tolerans %2 hacim azalmasıdır.

Tüm bu bilgiler çerçevesinde otoklavda sterilizasyon için dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda özetlenmiştir:

- Otoklav etkinliği kontrol edilmelidir. 04.07. Bölümde bu konuda bilgi vardır.

- Farklı hacimler beraberce otoklavlanmamalıdır. Otoklavda 10 mL hacimde sıvı besiyeri ile kalın et duvarlı bir kaptaki 1 litre hacimde agarlı besiyerinin beraberce sterilize edileceği ortalama bir ısı işlem uygulama süresi aramak tümüyle yanlış olacaktır. Bununla birlikte, günlük uygulamada farklı hacim ve bileşenlerdeki besiyerlerini ayrı ayrı otoklavlamak her zaman mümkün olmayabilir. Agarlı besiyerlerinin eritmek için önceden ısıtılmış olması, toplam ısı girişi çerçevesinde değerlendirilerek, bunların sıvı besiyerlerinde olan normlarda sterilize edilmesine olanak tanır. Ancak agarlı besiyerleri, olması gerekenden daha kısa süre ile (örneğin 20 dakika yerine 15 dakika) otoklavlanıyorsa, şahit olarak bu besiyerinden dökülmüş birkaç Petri kutusunun da inkübatöre konulması gerekir.

- Otoklavlama süresi besiyerinin hacmi, kullanılan cam kapların et kalınlığı, besiyerinin agarlı olup olmamasına göre belirlenmelidir.

- Besiyeri hazırlandıktan sonra ivedilikle sterilize edilmelidir. Dehidre besiyeri ve/veya besiyeri bileşenleri ile cam kaplar, su, tartım ekipmanı vb. materyalde mikroorganizma bulunması doğaldır. Bunlar hazırlanmış besiyerinde hızla gelişerek, besiyerinde başta pH değişmesi olmak üzere bir seri olumsuzluklar meydana getirir. Buna bağlı olarak hazırlanmış besiyerleri en geç 1 saat içinde sterilize edilmelidir. İçinde pepton olan Maximum Recovery Diluent, %0,1 pepton çözeltisi gibi seyreltme çözeltileri de besiyeri gibi düşünülmelidir. %0,85 NaCl bileşimindeki serum fizyolojik ise, hazırlandığı gün içinde sterilize edilmelidir.

-Tüm besiyerleri ısıya duyarlı olan pepton ya da ekstraktları içerir. Bu nedenle aşırı ısı girişinden kaçınılmalıdır. Pepton ve şekerleri içeren besiyeri aşırı ısı işlem görürse, Maillard reaksiyonu (karamelleşme) oluşur. Bu şekilde kararmış besiyerleri, yanlış hazırlandığı gerekçesi ile analizlerde kullanılmaz.

-Agar içeren besiyerleri ısıtılmadan önce birkaç dakika kendi halinde bırakılarak tam ıslanması sağlanmalıdır.

-Her sterilizasyon için tarih, başlama sıcaklığı, sterilizasyon sıcaklığına ulaşma ve bu sıcaklıkta tutulma süresini gösteren kayıtlar tutulmalıdır.

-Kullanılacak besiyerleri ile önceden kullanılmış ve yıkama öncesi sterilize edilecek besiyerleri aynı anda otoklavlanmamalıdır.

Bazı besiyerleri, otoklavda 121 °C'da 15 dakikadan daha düşük sıcaklık ve/veya sürelerde tutularak sterilize edilir. Enterobacter Enrichment Broth ve Litmus Milk (121 °C'da 5 dakika) sterilize edilir. MRS Agar ve MRS Broth daha farklı bir örnek olup, *Bifidobacter* spp. analizinde kullanılacak ise 118 °C'da 15 dakika, diğer laktik asit bakterileri için kullanılacak ise 121 °C'da 15 dakika olarak sterilize edilmesi önerilir.

Tüm besiyerlerinin üretici firma tarafından gösterilen şekilde otoklavlanması gerekir. Aynı besiyerine ait farklı marka ürünlerde de farklı sterilizasyon normları verilebilir.

04.02.02. Kaynatarak–Isıtarak Sterilizasyon

Bazı besiyerleri otoklavda sterilize edilmez. Örneğin VRB Agar besiyeri sadece kaynar su banyosunda 30 dakika tutulur. Burada, kaynar su banyosuna konulan VRB Agar besiyeri sıcaklığının kaynar su banyosunda 30 dakika tutulması kastedilmektedir. Bu süre, besiyeri merkez sıcaklığının 95–98 °C'a çıkması ve bu sıcaklıkta birkaç dakika kalması için yeterlidir.

Kaynatılarak hazırlanması gereken besiyerleri ideal olarak 100 °C'a ayarlanmış otoklavda tutularak sterilize edilir. Bazı elektronik modellerde olduğu gibi otoklav sıcaklığı 100 °C'a ayarlanamıyorsa, bu amaçla kullanılmaz.

Mikrodalga fırın varsa, kaynatmak amacı ile kullanılabilir. Bu işlemde besiyerinin taşması önlenmeli, fırın ara sıra çalıştırılarak sıcaklık hep kaynama sıcaklığına yakın tutulmalıdır. VRB Agar için kaynama sıcaklığına çok yakın sıcaklıkta birkaç dakika tutmak sterilizasyon için yeterlidir. Aşırı ısıtmanın VRB Agar gibi kaynatılarak sterilize edilen besiyeri performansını olumsuz yönde etkileyeceği de gözde uzak tutulmamalıdır.

Rambach Agar gibi bazı besiyerlerinin sterilizasyonunda sadece agarın eriyeceği kadar ısıtıl işlem uygulanır. Bu amaçla kaynar su banyosunda tutulan ya da mikrodalga fırında ısıtılan besiyeri ara sıra karıştırılarak, agarın tam olarak eriyip erimediği kontrol edilir. Agarın eridiğinin kontrolü ise yavaşça çalkalanan erlenin çeperlerinde erimemiş partikül kalıp kalmadığının gözlenmesi ile yapılır.

Selenite Cystine Broth gibi bazı besiyerleri ise 60 °C'da tutularak sterilize edilir. Bu amaçla sıcak su banyosu kullanılır ve erlen içinde de termometre bulunmalıdır. Sıcaklık istenilen değere ulaştığında birkaç dakika tutulur. Isıl işleme son derece duyarlı bu tip sıvı besiyerlerinin filtrasyon ile sterilize edilmesi önerilir.

Kaynatılarak ya da ısıtılarak sterilize edilen besiyerlerinde kullanılan pamukların arasına küçük sineklerin saklanabildiği, bunların kaynatma sürecinde canlılıklarını koruyabildiği ve sonra besiyerine düşerek kontaminasyona neden olabildiği görülmüştür. Laboratuvarda bulunan pamukların belirli sürelerde etüvde ya da otoklavda sterilize edilmesi bu sorunu ortadan kaldırır.

04.02.03. Tindelizasyon

Otoklav arızalı ya da doğru çalıştığından endişe ediliyor ise Tindelizasyon uygulanabilir. Bu amaçla besiyeri ya da çözelti kaynar su banyosunda 80 °C'da 1 dakika tutulup oda sıcaklığında 1 saat beklenir. Sonra kaynar su banyosunda kaynama sıcaklığında (95–98 °C) 30 dakika tutulur ve hızla soğutulup oda sıcaklığında 8 saat bırakılır. Bu işlem 2 kez daha (toplam 3 kez) uygulanır. Tindelizasyon işleminde 80 °C'da 1 dakikalık ısıtma ve hızla soğutma uygulaması sporların germinasyonu (vejetatif hale geçmesi) için gereklidir. 80 °C kritiktir ve bu amaçla mikrodalga fırın kullanılmaz.

Besiyeri ya da çözeltinin 30 dakika kaynatılması ile bakterilerin spor formu dışındaki tüm mikroorganizmalar öldürülür. Bekleme süreleri ve termal şok ile bakteri sporlarının vejetatif hale geçer. Ardından tekrar kaynatma ile bunlar da öldürülür. Son bekleme ve kaynatma, sterilizasyon güvenliği için uygulanır.

04.03. Kuru Sıcak Uygulaması

Besiyerleri ve çözeltiler gibi sıvıların kuru sıcakta sterilize edilmesi söz konusu değildir. Kuru sıcak uygulamasında etüvde sadece Petri kutuları, pipetler vb. gibi cam malzeme sterilize edilir. Sürtme (swab) örneği almak amacıyla ucuna pamuk sarılmış tahta ya da tel materyal ve homojenizasyon amaçlı kum da etüvde kuru sıcaklık uygulaması ile sterilize edilir.

Etüvde uygulanacak ısıt işlemler normu farklı kaynaklarda farklı şekilde verilmektedir. Bu kitapta benimsenen norm, FDA tarafından bildirilen şekli ile 170 °C'da 2 saattir.

Her sterilizasyon için tarih, başlama sıcaklığı, sterilizasyon sıcaklığına ulaşma süresi ve bu sterilizasyon süresinin uzunluğunu gösteren kayıtlar tutulmalıdır.

04.04. Membran Filtrasyon

Sadece bazı vitaminler, aminoasitler, şekerler gibi ısıt işlemler ile sterilize edilemeyen besiyeri bileşenleri, ayrıca buharları otoklava zarar vereceği gerekçesi ile asitler de membran filtrasyon ile sterilize edilir.

Rehidre (sulandırılmış) besiyerlerinin membran filtrasyon ile sterilize edilmesi alışılmış bir yöntem değildir. Sadece uzun süre depolanacak Selenite Cystine Broth besiyerinin membran filtre ile sterilize edilmesi gibi ender koşullarda membran filtre önerilir.

Besiyeri ve çözeltilerin sterilizasyonunda genellikle 0,45 ya da daha kesin sterilizasyon sağlamak üzere 0,20 µm por çaplı membran filtreler kullanılır. Yaygın olarak kullanılan filtreler tek kullanımlık (disposal) olup, steril bir şırınga ucuna vidalanır. Sterilize edilecek sıvı şırıngaya çekilir, filtre şırıngaya vidalanır ve bu şekilde sterilize edilmiş sıvı steril bir kaba aktarılır.

Filtre ile sterilizasyonda dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda özetlenmiştir:

-Filtre edilecek çözeltinin tam çözülmüş olması gerekir.

-Filtre edilmiş çözelti (filtrat) mutlaka steril bir kaba aktarılmalıdır.

-Filtrede sadece standart boydaki mikroorganizmalar tutulur, ancak virüs ve çok küçük boylu bazı mikroorganizmalar filtre altına geçer. Buna göre, membran filtrasyon uygulamasının mutlak bir sterilizasyon olmadığı göz önünden uzak tutulmamalıdır.

04.05. Kimyasal Madde ile Sterilizasyon

Kimyasal maddelerin mikroorganizmalar üzerine farklı etkileri vardır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında en yoğun kullanılan dezenfektan, alkoldür. Aksine bir belirtme olmadığı zaman, alkol denildiğinde "etil alkol" anlaşılır. Gerek yayma ekimde kullanılan Drigalski spatüllerinin, gerek ambalajın gerekse çalışma tezgahlarının dezenfeksiyonunda yaygın olarak alkol kullanılır.

Genel olarak kimyasal maddelerin konsantrasyonu arttıkça dezenfeksiyon etkileri de artar. Ancak, bir istisna olarak alkolün en etkili olduğu konsantrasyon %76 (v/v)'dir. Buna göre %76'lık alkol, saf alkolden daha fazla etkilidir. %76 (v/v) alkol hazırlanması için basit olarak saf (%96–99) alkolden 4 hacim alınıp, üzerine 1 hacim saf su ilave edilir (bakınız; 03.08. Bölüm).

Alkol ile sterilizasyonda aşağıdakilere dikkat edilmelidir.

- Alkol ile temas süresi en az 2 dakika olmalıdır. Yoğun olarak çalışılan denemelerde yeteri kadar cam Drigalski spatülü bulundurulmalıdır. Sporlu bakteriler alkol ile dezenfeksiyona daha dirençlidir ve standart toplam bakteri sayımları sırasında, olduğundan daha fazla sayım sonucuna neden olabilirler.

- Alkolün etkinliği her çalışma periyodunda kontrol edilmelidir. Bu amaçla ekim işlemi bittikten sonra kullanılmış alkolden bir Plate Count Agar besiyerine 0,1 mL aktarılıp, standart şekilde yayma yapılır ve Petri kutusu 28 °C'da 48 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra bu Petri kutusunda hiçbir mikroorganizma gelişmesi görülmemelidir.

- Alkol açıkta bırakılırsa suya göre daha fazla buharlaşır, konsantrasyonu düşer ve etkisi azalır. Bu nedenle işi biten alkol ağzı sıkıca kapanan bir kapta korunmalıdır.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında içinde patojen olan bir kabın düşüp kırılması gibi karantina uygulanması durumunda, alkol yeterli olmaz. Buna bağlı olarak, laboratuvarında gerek bu tip kazalara karşı gerek işe başlamadan ve gerek iş bitiminde çalışma masaları ile ellerin dezenfeksiyonunda kullanılmak üzere ticari olarak hazırlanmış dezenfektanlar bulundurulmalıdır.

Bazı hallerde pipet ya da pipet ucu gibi kullanılmış malzemenin doğrudan dezenfektan içeren bir sıvıya bırakılması gerekir. Bu gibi uygulamalarda kullanılacak dezenfektan konsantrasyonu ve uygulama süresi, üretici firma talimatına göre yapılmalıdır. Bu şekilde dezenfekte edilecek materyalin tümüyle ıslanması, kap içinde hava kabarcıkları kalmaması sağlanmalıdır.

Mikroorganizma kültürlerinin yıkama öncesi sterilizasyonu çoğunlukla otoklavda yapılmakla birlikte, bazen kimyasal dezenfeksiyon uygulanır. Standart boyda Petri kutusundaki kültür için en az 10–15 mL dezenfektan gece boyunca uygulanmalıdır. İndol testinden sonra tüplerin kendi halinde bir gece bırakılması ile Kovacs' ayırıcındaki kimyasallar yeterli dezenfeksiyon sağlar.

Dezenfektanların çoğunun toksik etkisi olduğ u unutulmamalıdır. Dezenfektan uygulamasından sonra malzeme iyice çalkalanmalı, sonra yıkanmalıdır. Ellerin dezenfeksiyonu için kullanılan bazı dezenfektanlarda uygulamadan sonra ellerin çalkalanmaması gerekir.

04.06. Işınlama ile Sterilizasyon

Işınlama uygulaması, iyonlaştırıcı radyasyon ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak iki ana gruba ayrılır. İyonlaştırıcı radyasyonun yaydığı enerji 30–34 eV'dan daha yüksektir; X ve gama ışınları bu grupta yer alır. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon ise bu değerden daha düşük enerji yayar; UV ışını bu grupta yer alır.

Dalga boyu 10 nm'den ($100 \text{ \AA}$) daha kısa olan X ışınları ve dalga boyu 0,1 nm'den daha kısa olan gama ışınlarının penetrasyon yeteneği vardır ve buna bağlı olarak ambalajlanmış materyalin sterilizasyonunda kullanılır. Penetrasyon yeteneğinde olmayan UV ışınlarının dalga boyu çok daha yüksektir. Endüstriyel uygulamalarda Co^{60} ve Cs^{137} kaynağından elde edilen gama ışınları ile X ışınları kullanılır.

UV ışınının kısıtlı bir endüstriyel kullanımı vardır. Ancak, UV ışınlarının basit olarak sağlanan lambalardan elde edilmesi ve kullanım kolaylığı nedeni hava, su, düzgün yüzeyler gibi örneklerde mikroorganizma yükünün indirilmesi için yaygın kullanım alanı vardır.

UV spektrumunda farklı dalga boylarında UV ışınları vardır. MUG reaksiyonunun belirlenmesinde 366 nm uzun dalga boylu UV ışını kullanılırken, 210–300 nm dalga boyundaki ışınlar yüksek absorpsiyonlarına bağlı olarak kuvvetli öldürücü etki yapar. UV spektrumu içinde mikroorganizmalar üzerine en fazla etkili olanı 253,7 nm dalga boyundaki ışındır.

Basit fizik yasaları uyarınca UV ışının etkisi aydınlatma gibidir. UV ışının etkisi; kullanılan lambanın gücü ile doğru, lambda ile sterilize edilecek materyal arasındaki uzaklığın karesi ile ters orantılıdır.

Buna göre; tavana asılmış bir UV lambası kullanıldığında, tavana yakın olan yerlerdeki mikroorganizmalar, tabana yakın olanlardan daha fazla etkilenir.

UV lambaları, mikrobiyoloji laboratuvarlarında havanın ve çalışma tezgahlarının sterilizasyonu için kullanılır. Pratik uygulamada UV lambaları gece boyunca açık bırakılır. Bu ışına uzun süre ve yakından bakılması halinde gözde önemli hasarlar meydana gelebilir. Bu nedenle UV lamba düğmesinin laboratuvar kapısının dışında olması önerilir. Kapalı bir kabin içine yerleştirilmiş UV lambaları etrafından hava geçirilerek, bunlar çalışma süresi içinde de kullanılabilir.

UV lambalarının kullanımında belirli bir "lambda ömrü" olduğu dikkate alınmalıdır. Bu süre sonunda da, lambadan aynı açık mavi ışık görülür, ancak bunun içinde etkili dalga boyunda UV ışını kalmamıştır. UV lamba kullanılacak ise satıcı firmadan standart kullanım ömrü öğrenilmelidir. Farklı markalarda farklı kullanım ömrü olabilir. Kullanım ömrü genel olarak 9.000 saattir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı açısından X ve gama ışınlamasının pratik uygulaması yoktur. Sadece ışınlanmış Tryptic Soy Broth ve ReadyCult gibi uygulamalar için kullanılmaktadır.

04.07. Sterilizasyon Kontrolü

Sterilizasyon işleminin etkinliği, kimyasal ya da biyolojik indikatörler ile kontrol edilir. Kimyasal indikatörlerin en yaygın kullanılanı otoklav şeritleridir. Otoklava konulan malzemeye bu şeritlerden yapıştırılır. Standart otoklavlama süresinde (121 °C; 15 dakika) şerit renk değiştirir. Aynı uygulama kuru hava sterilizasyonu için de yapılmaktadır. Kuru hava ve otoklav sterilizasyonu için farklı şeritler kullanılır.

Otoklavda sterilizasyon kontrolü için biyolojik sterilizasyon indikatörü (Sterikon) kullanılması da önerilir. Bu kullanım pek çok uluslararası standartta, örneğin FDA Form 2400 (3/01)'de yer almaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan bakteri *Geobacillus stearothermophilus* (Syn. *Bacillus stearothermophilus*) sporlarıdır. Bu sporlar, içinde 2 mL Nutrient Broth ve bir pH indikatörü olan ampul içinde yaklaşık 10^7 sayıda bulunur. Sporların 121 °C'daki D değeri 2 dakikadır. Buna göre 121 °C'da 15 dakikalık ısıl işlemde tümüyle ölürler.

Standart bir otoklavlama işleminde 250 litre hacme kadar olan otoklavlar için 2 ampul, daha büyük olanlar için 6 ampul farklı yerlere yerleştirilir. Otoklavlama sonunda ampuller otoklavlanmamış olan şahit 1 ampul ile birlikte 60 °C'da 48 saat inkübe edilir. Otoklav doğru çalışıyorsa (121 °C'a erişip, bu sıcaklıkta 15 dakika kalıyorsa), ampul içindeki tüm sporlar ölmüş olacağı için inkübasyon sonunda ampullerde bir değişiklik olmaz ve menekşe renk korunur. Aksi halde ampulde sterilizasyon yetersizliği nedeni ile tek bakteri sporu bile canlı kalırsa, bu spor önce germine olur, sonra hızla çoğalır ve pH indikatörü aracılığı ile ampul rengi sarıya döner. Bu biyolojik indikatör hakkında 40.08. Bölümde ayrıntılı bilgi vardır. Bu tip indikatörlerin kullanılamaması halinde, alışlagelmiş bir sterilizasyon kontrol yöntemi "şahit besiyeri" kullanmaktır. İnoküle edilmemiş bir besiyerinin inoküle edilmişler ile birlikte inkübe edilmesi, sterilizasyonun ne denli sağlandığını gösterebilir. Bu konuda yapılabilecek büyük bir hata, agarlı besiyeri olan Petri kutularının tümünün 48 saat inkübatörde bırakılarak sterilite testi yapılmasıdır. Böyle bir uygulamada steril olduğuna karar verilen besiyerlerinde gereğinden fazla kuruma olacak ve ekim sonrası istenilen performans alınamayacaktır.

Kuru sıcak uygulamasında sterilizasyon etkinliği, *Bacillus atrophaeus* (Syn. *Bacillus subtilis* var. *niger*) ile kontrol edilir. Standart kuru hava sterilizasyonu sırasında etüvde farklı yerlere konulacak Petri kutuları içine 10^6 düzeyinde spor emdirilmiş olan şeritler yerleştirilir. İşlem bitince bu şeritler Tryptic Soy Broth besiyeri içine atılıp, 28–30 °C'da 48 saate kadar inkübe edilir.

Sterilizasyon yeterli bir şekilde yapıldı ise besiyerinde bir gelişme olmaz. Aksi halde besiyeri renginde bir bulanıklık ile sporların öldürülmesinin yetersiz kalmış olduğu anlaşılır.

Membran filtrasyon ile yapılan sterilizasyonun kontrolü için, 10^7 *Pseudomonas diminuta* içeren 100 mL seyreltme çözeltisi filtre edilir ve 10 mL filtrat, 10 mL çift kuvvetli Tryptic Soy Broth'a ilave edilerek, 28–30 °C'da 48 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyerinde gelişme (bulanıklık) görülmemelidir.

04.08. Sterilize Edilmeyen Çözeltiler

Besiyerlerinin bileşimine giren antibiyotikler gibi bazı katkıların sterilizasyonuna gerek yoktur. İlgili talimatlarda yazıldığı şekilde üzerlerine sadece steril su (ya da steril su + alkol) ilave edilir. Çözelti halinde ise doğrudan kullanılır.

Yumurta sarısı ile yumurta sarısı tellurit emülsiyonu gibi bazı katkıları üretici firma tarafından önceden sterilize edildikleri için, ayrı bir sterilizasyon işlemine gerek yoktur. Bununla birlikte, çoğu üretici firma tarafından yumurta ve ürünlerinin sterilizasyon kontrolü yapılması önerilir.

Yumurta sarısı emülsiyonunun laboratuvarında hazırlanması gerekli ise, %76 (v/v) etil alkol çözeltisinde en az 5 dakika tutulur. Sonra sarısı ve beyazı ayrılıp, sarısı steril bir kaba alınır. Bu amaçla dış kabuğu kirli olan ya da kirli olduğundan endişe edilen yumurtalar kesinlikle kullanılmamalı, asla kirli kabuğun fırçalanarak temizlenmesi yoluna gidilmemelidir.

Başta Kanlı Agar olmak üzere çeşitli besiyerlerinin bileşimine katılan kanın "steril olduğu" kabul edilir. Bunun için sağlıklı bir hayvandan aseptik koşullara uyarak kan alınmalıdır. Kanlı agar tercihen dış laboratuvarından sağlanmalıdır (bakınız; 10. ve 40.06. Bölüm).

04.09. D ve Z Değerleri

Öldürücü düzeyde herhangi bir işlemin (ısıtma işlemi, kimyasal madde uygulaması, ışınlatma) canlılar üzerindeki etkisi, zamana bağlı bir fonksiyon olarak verilir. Tam olarak tanımlanmış bir uygulamada, belirli bir canlı türü için sayının %90'ının (1 log birimi) azalması için gereken süre D değeri (desimal indirgeme süresi) olarak tanımlanır ve dakika ile ifade edilir. D değeri, öldürücü bir işlemin etki süresi ile ilgilidir ve bu nedenle sadece fiziksel bir ayırma işlemi olan membran filtrasyon için söz konusu değildir.

Buna göre;

-Uygulamanın yapıldığı ortam tam olarak tanımlanmalıdır (yağsız içme sütü, yarım yağlı dana kıyması vb.).

-Hedef mikroorganizma tür hatta serotip düzeyinde tanımlanmalıdır (*Bacillus cereus* sporu, *E. coli* O157:H7 serotipi vb.).

-Uygulanan işlem tam olarak tanımlanmalıdır (108 °C'da buharlı sterilizasyon, ışınlama, %73 alkol vb.).

Geobacillus stearothermophilus sporlarının Nutrient Broth ortamında 121 °C'daki D değerinin 2 dakika olması, her 2 dakika sonra spor sayısında 10 misli (1 log birimi) azalma olacağını (sporların %90'ının ölüp, %10'unun canlı kalacağını) ifade eder. Bir diğer deyiş ile, 121 °C'da başlangıçta (0 anı) 10^7 olan spor sayısı, 2 dakika sonra 10^6 , 4 dakika sonra 10^5 , 14. dakika sonra $10^0=1$ bakteriye düşecek ve 1 dakika sonra bu bakteri de öleceği için Sterikon sterilize edilmiş olacaktır.

Aynı mikroorganizma, aynı öldürücü işlem olsa bile ortamdaki pH, şeker konsantrasyonu gibi faktörler D değeri üzerine önemli etki yapar. pH ne kadar düşük ise ısıl işlemin etkisi o denli artar. Ancak, yüksek şeker konsantrasyonu bazen mikroorganizma üzerinde koruyucu etki oluşturur. Bu nedenle D değeri ifade edilirken, ortam belirgin bir şekilde tanımlanmalıdır.

Isıl işlemde D değeri, uygulanan sıcaklık ile birlikte verilir. $D_{109}= 0,3$ dakika; 109 °C'da her 0,3 dakikada (18 saniyede) canlılıkta 1 log azalma olacağını gösterir.

Endüstriyel ışınlamada D değeri kavramı biraz farklıdır. Isıl işlemde farklı sıcaklıklar, kimyasal uygulamada farklı konsantrasyonlar uygulanmakla beraber, ışınlamada konsantrasyon farkı yoktur. Işın kaynağının belirli bir gücü vardır. Bu güç ilave üniteler ile artırılabilirse öldürücü etki canlılığın absorbe ettiği enerji ile ilişkilidir. Işın kaynağının Co^{60} ya da Cs^{137} olması da önemli değildir. *E. coli* için gama ışınlamada yağsız kıyma için $D_{10}= 0,30$ kGy ifadesi, gücü ne olursa olsun bir ışın kaynağından elde edilen gama ışınlarının her 0,30 kGy uygulanması halinde canlılıkta 1 log azalma olacağını gösterir. Bazı ışın kaynakları, bu dozu 30 dakikada, bazıları 5 dakikada verebilirse de, bu önemli değildir ve D değeri yaklaşımı ile uyumsuz olmaz. Önemli olan, kaç kGy ışın verildiğidir.

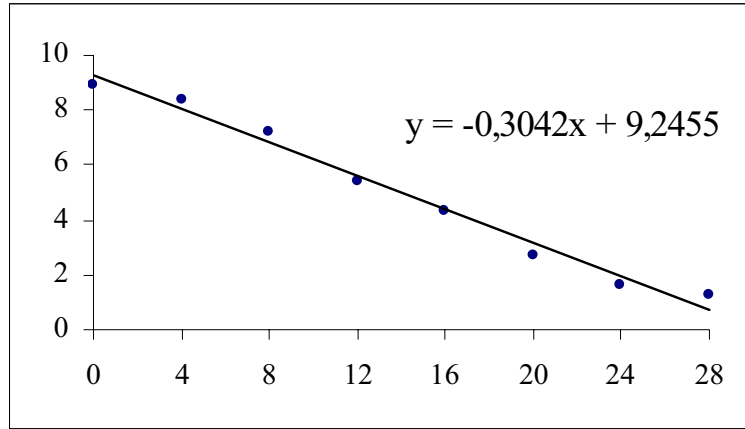
Isıl işlemde "D" altında genel olarak uygulanan sıcaklık derecesi verilirken, ışınlamada genel olarak "D altı 10" yazılır. Bunun nedeni, ışınlama ile ısıl işlem arasında yukarıda açıklanan farklılıktır ve logaritmik bir işlem olduğunu belirtmek üzere D_{10} olarak belirtilir. Isıl işlemde de D_{10} belirtmelerine rastlanır. Bu belirtme, $\log_{10}$ ifadesi gibidir. Bununla beraber, bazı kaynaklarda ısıl işlem ve kimyasal madde uygulaması için de D_{10} şeklinde belirtmeler vardır.

Aşağıda D değeri hesaplaması için bir örnek verilmiştir.

Çizelge 05. D Değeri

Süre	log kob/mL
0	8,963
4	8,380
8	7,204
12	5,410
16	4,342
20	2,690
24	1,653
28	1,255

Şekil 07. D Değeri grafiği



Elde edilen verilerin bilgisayar ortamında MS Excel ya da benzeri bir program kullanılarak grafiği çizilir. Eğim çizgisinin formülünü bu program verir. Bu örnekte $Y = -0,3042X - 9,2455$ olarak elde edilen denklemde, Y için ardışık 2 sayı (örneğin, 5 ve 6) verilerek bunlara karşı gelen X değerleri hesaplanır. Fark, D değeridir. Yine bu örnekte $Y = 5$ için $X = 13,97$ ve $Y = 6$ için $X = 10,63$ olarak bulunur ve bu 2 X değeri farkı olan 3,34 dakika= 200 saniye, D değeri olarak hesaplanır.

Genel bir yaklaşım ile, öldürücü etkiye sahip uygulamalarda konsantrasyon arttıkça öldürücü etki de artar (alkol bu genellemenin dışındadır). Buna göre 96 °C'da yapılan uygulamada $D_{96} = 3$ dakika olarak bulunuyorsa, aynı koşullarda ve aynı mikroorganizma için sıcaklık artırıldığında daha kısa ve tersine olarak sıcaklık azaltıldığında daha uzun süreli D değerleri elde edileceği açıktır. Benzer şekilde, bir kimyasalın %1 derişimde D değeri 4 dakika ise, %2 derişimde daha kısa ve %0,2 derişimde daha uzun D değerleri elde edilecektir.

Z değeri, genellikle ısı işlem için kullanılan bir kavramdır ve °C olarak ifade edilir. D değerinde 1 log birimi değişiklik için gereken sıcaklık değişimi olarak tanımlanır. Örneğin, $D_{96} = 3$ dakika ise D değerinde 1 log birimi değişiklik, yani D değerinin 0,3 dakika olması için sıcaklığın ne olması gerektiğidir. Buradaki örnekte $Z = 6,7$ °C olarak bulunursa sıcaklık $96 + 6,7 = 102,7$ °C ısı işlemde D değeri 0,3 dakika ve tersine olarak $96 - 6,7 = 89,3$ °C'da D değeri 30 dakika olacaktır.

D ve Z değerleri laboratuvarından çok endüstriyel uygulamalar için geçerlidir. Bu kitapta kısaca yer almasının nedeni, bu kitabın işletmede çalışan teknik elemanlara da yararlı olması dileğidir.

05. Örnek Alma, Homojenizasyon ve Seyreltme

05.01. Örnek Alma	73
05.01.01. Örnek Miktarı	73
05.01.02. 2 ve 3 Sınıflı Planlar	75
05.01.03. Örneğin Laboratuvara Getirilmesi ve Kabulü	76
05.01.04. Örneğin Açılması	77
05.02. Homojenizasyon	79
05.02.01. Homojenizatörler	81
05.02.02. Homojenizasyon ve Seyreltme Çözeltileri	81
05.02.03. Homojenizasyon ve Seyreltme İşlemi	82

05.01. Örnek Alma

Gıdalardan mikrobiyolojik analiz için örnek almak ve bunu "örnek alındığı andaki mikrobiyolojik kriterleri tümüyle koruyarak" laboratuvara getirmek oldukça zordur. Numunenin hangi miktarda ve kaç adet alınacağı, laboratuvara getirilmesi, açılması ve ekim için hazırlık gibi konular üzerinde titizlikle durulmalıdır.

05.01.01. Örnek Miktarı

Pek çok ulusal ve uluslararası standart, analiz edilecek gıda miktarını 10 g (mL) olarak verir. Bu değer sadece sayım yapılacak analizler için geçerlidir. Patojenler genellikle 25 gram gıdada var/yok testi ile analiz edilir.

Analize alınacak örnek miktarı doğrudan gıdanın çeşidi ile de ilgilidir. Pastörize sütte 10 mL örnek alınıp, bunun 1 mL'si koliform analizi için VRB Agar'a ekilebilir. Sucukta ise mutlaka homojenizasyon yapılmak zorundadır. Laboratuvar tipi standart bir blender kullanılıyor ise 10 gram sucuk + 90 mL homojenizasyon çözeltisi yeterli değildir, blender bu düşük miktarı homojenize edemez. Dolayısı ile yaygın kullanılan şekli ile 25 gram sucuk + 225 mL homojenizasyon çözeltisidir.

Standart bir analizde 10 g örnek yeterli olmakla birlikte, yukarıda belirtildiği gibi özel homojenizasyon gereksinimleri uyarınca, ilave her patojen testi için genellikle 25 g gıda maddesi gerekir. Buna göre toplam bakteri, koliform grup bakteriler, maya ve küf ile stafilokok için 10 g, *Salmonella* ve *Listeria* analizi için her birinden 25 g olmak üzere en az 60 g numunenin laboratuvara getirilmesi gerekir.

Bir örnekten kaç adet alınması gerektiği çoğu kez kavram karışıklığına neden olmaktadır. Gıda endüstrisinde yapılan günlük kontrollerde sadece 1 numune genellikle yeterlidir.

İşletme isterse her partiden 2, 3, 6 gibi dilediği sayıda örnek ile çalışabilir. Bununla beraber, kamu tarafından yapılan denetlemelerde 5 örnek ile çalışılma zorunluluğu vardır. Bunun nedeni, kamunun, analiz ettiği gıdayı, gıda yasalarına uyup uymadığı açısından denetlemesidir. Ulusal ve uluslararası pek çok gıda yasasında bu koşul açıkça belirtilir. Ulusal ya da uluslararası ticarete bu sayı farklı olarak alınabilir.

Alınan örnek sayısının ilgili partiyi temsil etmesi ayrı bir sorundur ve genellikle partinin ne kadar homojen olduğu ile de yakından ilişkilidir. Bir süt tankerinin altından ya da üstünden alınan örneklerde farklı mikroorganizma sayıları çıkması beklenebilir. Tankerden örnek alımı öncesinde mutlak bir homojenizasyon beklenemez. Karkas örneklerinde toplam bakteri sayılması için örnek miktarı 10 gram olarak tanımlanıyorsa, karkasın yüzeyinden doğru ince bir şerit halinde alınan örnek ile dar bir et sondası ile gövdenin içine doğru girilip, alınan örnek arasında farklı sonuçlar bulunması doğaldır. Bu gibi homojen olmayan kütlelerden örnek alım yöntemi, ilgili talimatlarda açık bir şekilde belirtilmelidir.

Büyük ambalajlara (250 kg, 1 ton vb.) aseptik dolum yapılan salça, meyve suyu konsantresi gibi örneklerde, ticari değer açısından örnek alımı farklı bir şekilde yapılır. Bu uygulamada aynı dolum başlığından örnek torbası olarak tanımlanan 2–3 kg ambalajlara örnek alınır ve analiz bu ambalajda yapılır.

Bu gibi ayrıntılar nedeni ile, özellikle gıda işletmelerinde yapılacak analizlerde alınacak numunenin partiyi ne ölçüde temsil ettiği incelenmelidir ve olabildiğince rastgele örnek alınması sağlanmalıdır.

Örnek sayısı ile ilgili genel kurallar aşağıda özetlenmiştir:

-Çocuklar, yaşlılar, hamileler ve hastalar için hazırlanan gıdalardan daha fazla örnek alınmalıdır.

-Analizi sırasında homojenizasyon sorunu olan gıdalardan (örneğin fındık ezmesi) daha fazla sayıda numune alınmalıdır.

-Ambalaj boyutu küçüldükçe daha çok sayıda örnek alınmalıdır.

-Büyük ambalajlar ile dökme ve yığın ürünlerden kompozit örnekler hazırlanmalıdır.

-Çabuk bozulabilen gıdalardan daha çok örnek alınmalıdır.

-*Salmonella*, *Listeria* vb. patojen riski yüksek olan gıdalardan daha çok örnek alınmalıdır.

-Alınacak örnek sayısı uygulanan teknolojiye bağlıdır. Basit teknoloji uygulayan işletmelerde modern olanlara göre daha çok numune alınması gerekir.

-Ürünün pazar payı ile doğru orantılı olarak örnek alınmalıdır.

05.01.02. 2 ve 3 Sınıflı Planlar

Genel olarak n , c , m ve M olarak tanımlanan değerler ile yapılan örnekleme planlarından 2 sınıflı olanda sadece n , c ve m değerleri dikkate alınır.

2 sınıflı planlama genellikle patojenlere yönelik olarak var/yok testlerinde kullanılır ve çoğunlukla 20, 30 gibi " n " değerleri ile ifade edilir.

3 sınıflı planlar, sayıma yönelik testlerde ve var/yok analizlerinde kullanılır. Günlük uygulamada özellikle kamu tarafından yapılan kontrollerde yaygın kullanılan plan budur. Pek çok yerde analizi yapılan gıdada yasal olarak bulunmasına izin verilen mikroorganizma sınırı n , c , m , M ile gösterilir. Burada;

n : Analize alınacak örnek sayısı,

c : M değeri taşıyabilecek en fazla örnek sayısı,

m : ($n - c$) sayıdaki örnekte bulunabilecek en fazla değer,

M : c sayıdaki örnekte bulunabilecek en fazla değer olarak tanımlanır.

Aşağıda, bu konuda örnekler verilmiştir:

$n = 5$; $c = 2$; $m = 5.000$; $M = 50.000$ ise;

-5 (n) adet örnekten 2 adedinde (c) mikroorganizma sayısı en fazla 50.000 (M) olabilir.

-5 örnekten (n) geriye kalan 3 adedinde ($n-c$) mikroorganizma sayısı en fazla 5.000 (m) olabilir.

-5 örnekten (n) biri 50.000 değerini (M) geçerse parti reddedilir.

-5 örnekten 3 ya da daha fazlasında 5.000 (m) değeri geçilirse yine parti reddedilir. Çünkü, $c = 2$ olması gerekirken bu durumda 3 ya da daha fazla sonuç elde edilmiş olacaktır. Bu örnek genellikle toplam bakteri gibi genel kalite kriteri olan analizler için verilmiştir.

$n = 5$; $c = 1$; $m = 0$; $M = 9$ ise;

5 (n) adet örnekten sadece 1 (c) adedinde en fazla 9 (M) mikroorganizmaya izin verilir ancak diğer sayımlar 0 olmalıdır. Bu sayının herhangi bir ya da daha fazla örnekte 9'dan fazla olması ve/veya 2 ya da daha çok örnekte 1–9 arasında olması halinde parti reddedilir. Bu örnek genellikle koliformlar gibi hijyen indikatörü analizleri için verilmiştir.

$n = 5$; $c = 0$; $m = 0$; $M = 0$ ise;

5 adet (n) örneğin hiçbirinde aranan mikroorganizma bulunmamalıdır. Sayı önemli değildir, bir ya da daha fazla örnek pozitif olarak değerlendirilirse parti reddedilir. Bu örnek genellikle *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 serotipi gibi patojenlerin analizi için verilmiştir.

05.01.03. Örneğin Laboratuvara Getirilmesi ve Kabulü

İşletmeden alınan örnek, mümkün olan en kısa süre içinde ve örnekteki mikroorganizma sayısını artıracak ya da azaltacak koşullardan tümüyle arındırılmış olarak laboratuvara getirilmeli ve analize alınmalıdır.

Steril, kuru ve nem geçirmeyen ambalajlardakiler gibi mikrobiyel yönden stabil ürünlerde, taşıma sırasında soğutmaya gerek yoktur. Buna karşın işlem görmemiş, soğutulmuş, pastörize edilmiş, bozulmuş vb. gıdalar 0 °C ile +4 °C arasında, dondurulmuş ürünler ise -18 °C'da taşınmalı, bombaj yapmış (veya bombaj tehlikesi olanlar) olası patlamalara ve sızıntılara karşı ayrıca ambalajlanarak laboratuvara getirilmelidir.

İşletme içinde prosesin çeşitli aşamalarında alınacak örneklerin aseptik koşullar altında ve steril ambalajlara alınması deneyim gerektirir.

Öncelikle, laboratuvar tarafından analize alınmak üzere numune kabul edilmelidir. Bu kabul için laboratuvar personeli, numunenin laboratuvara gereken koşullarda getirilip getirilmediğini kontrol etmeli, eğer standart koşullarda getirildiğine emin olursa numuneyi analiz için kabul etmeli, aksi halde ya kabul etmemeli ya da kabul formuna bununla ilgili tüm olumsuzlukları yazmalıdır.

Gerek kamu kontrol kuruluşlarının gerek gıda endüstrisindeki bir otokontrol laboratuvarının gerek özel bir gıda analiz laboratuvarının analiz için getirilen numuneyi kabul etmeme hakkı vardır.

Laboratuvara gelen ve kabul edilen örnek için, laboratuvarın özelliğine göre kabul tarihi, kabul saati, ürün ile ilgili tüm bilgiler (üretim tarihi, ambalaj özellikleri, parti numarası, vardiya numarası, numunenin alındığı saat, gerekli ise örnek alım sıcaklığı, laboratuvara giriş sıcaklığı vb.) kayda alınmalıdır.

Bombaj yapmış ambalajlar açılırken laboratuvar kazasına karşı dikkatli olunmalı, açım sırasında personel zarar görmemelidir. Kalın bir torba içine konulan bombajlı örnek, torbaya el sokularak açılır. Bu şekilde, eğer patlama olursa laboratuvarın kontaminasyonu önlenmiş olur. Laboratuvarın bombaj nedeni ile önceden patlamış, sızıntı olmuş örneği kabul etmeme hakkı vardır ya da bu durum raporda belirtilir.

Sıcaklık ölçümü yapılacak ise önceden soğutulmuş termometre kullanılmalıdır. Önceden soğutma, elektronik ve dijital termometreler için gerekli değildir.

Dondurulmuş sıvı ürünler mikrobiyolojik veya somatik hücre analizi için kabul edilmez. Eğer kimyasal testler de yapılacak ise, öncelikle mikrobiyolojik analiz için alt örnekler ayrılmalıdır.

05.01.04. Örneğin Açılması

Analiz için gelen örnek mümkün olan en kısa süre içinde analize alınmalıdır. Analiz için bir süre beklemek zorunluluğu varsa;

-Mikrobiyolojik olarak stabil olan ürünler son kullanma tarihinden önce ve elden geldiği kadar çabuk olarak analize alınmalıdır.

-Taze ve soğutulmuş ürünler kabulden sonra 24 saat içinde analize alınmalıdır. Daha uzun bir depolama süresi kaçınılmaz ise, ürün derhal dondurulmalı ve -18 °C'ın altında depolanmalıdır. Dondurma işlemi ürünlerdeki mikrobiyel florayı etkileyeceği için, bu durum analiz raporunda açıkça belirtilmelidir. *Cl. perfringens* gibi bazı mikroorganizmalar dondurma işleminden çok fazla etkilenir. Buna göre, analiz öncesinde dondurulmuş taze ürünlerde *Cl. perfringens* analizi yapmanın gereği yoktur.

-Dondurulmuş ürünler +4 °C buzdolabı sıcaklığında çözündürülmelidir. Bu işlemde büyük porsiyonlar halindeki ürünlerin çözülmesinin küçük porsiyonlu olanlara göre daha uzun süre alacağı, çözündürme süresi içinde psikrofil bakterilerin gelişebileceği gözden uzak tutulmamalı, dolayısıyla gıda olanaklar ölçüsünde 50 gramdan fazla olmayacak porsiyonlar halinde dondurulmalıdır. Eğer örnek önceden tartılarak dondurulduysa, doğrudan homojenizasyon çözeltisine aktararak çözündürülebilir.

-Pastörize ve benzeri ürünler son kullanma tarihinden önce ve elden geldiği kadar çabuk analize alınmalıdır.

-Dondurulmuş ürün analiz amacıyla çözündürüldü ise analiz ertelenemez.

Laboratuvara gelen ve kabul edilen numunenin paraleli analiz bitinceye kadar ürün özellikleri değişmeyecek şekilde şahit olarak korunmalıdır.

Kapalı ambalaj (tüketici ambalajı veya laboratuvar analiz ambalajı) ile laboratuvara getirilen örnekler mikrobiyolojik analize alındığında, numunenin çevreden, çevrenin de numuneden kontamine olması önlenmelidir. Bu konuda standart laboratuvar kurallarına uyulmalıdır.

Kapalı ambalaj açılmadan önce, açılacak yer ve çevresi %76 (v/v) alkol ya da uygun bir diğer kimyasal ile dezenfekte edilmeli ve ambalaj uygun ise ayrıca alevden geçirilmelidir. Alevden geçirilemeyecek (kağıt vb.) ambalajlarda kimyasal dezenfeksiyondan sonra dezenfektan steril su ile silinerek uzaklaştırılmalı, dezenfektan hiçbir şekilde gıda örneğine karışmamalıdır. Aksi halde sahte negatif sonuç alınabilir. Açımda kullanılacak makas, konserve açacağı, şişe açacağı, bistürü vb. materyal önceden uygun bir ambalaja (kağıt, mutfak tipi alüminyum folyo) sarılarak etüvde ya da otoklavda sterilize ya da dezenfekte edilmiş olmalıdır.

Analiz amacı ile ambalaj açıldıktan sonra analiz, elektrik kesintisi gibi zorunlu haller dışında ertelenmemelidir. Böyle bir zorunluluk halinde analizin ertelenmesi gerekiyorsa ambalaj tekrar kapatılmamalı, analize alınacak gıda, laboratuvarında her an bulunması gereken steril bir kaba aktarılarak korunmalıdır.

Sıvı örnekler doğrudan analize alınabilir. Katı gıdalar ise tartım, homojenizasyon vb. gibi ön işlemlerden geçmek zorundadır.

Katı örneklerde belirli bir ağırlığın (10 g, 25 g vb.) tartılması aseptik koşullar altında yapılmalıdır. Dikey tip ekim kabini içinde tartım yapılması en sağlıklı yöntemdir. Tartımın yapılacağı kap önceden sterilize edilmiş, seyreltme veya *Salmonella* 'da olduğu gibi ön zenginleştirme besiyerini rahatlıkla alabilecek boyutta olmalıdır.

Katı gıda maddesi tartım sırasında sorun çıkaracak büyüklükte ve nitelikte parçalardan oluşuyor ise, tartımdan önce uygun boyutlara parçalanmalıdır.

Terazi üzerine gereksiz ağırlık konulmasının sakıncalı olması ve eğer istenilen ağırlıktan daha fazla parça aktarıldı ise bunun geri alınmasındaki zorluk nedenleri ile, prensip olarak tartımlar erlen, beher gibi kaplara değil, steril saat camı, steril Petri kutusu, steril alüminyum folyo gibi materyalde yapıp, tartılmış örnek daha sonra içinde besiyeri olan erlene, blendere ya da stomachere alınmalıdır.

Tartım sırasında numunenin hedeflenen ağırlığa kesin olarak getirilmesini sağlamak amacı ile kontaminasyon riskini artıracak düzeyde uğraşılmamalıdır. Bu konuda deneyim önemlidir. Bazı gıdaların (örneğin parça et) önceden küçültülmüş olsa da tam olarak 10,0 gram tartılması hayli zordur. Böyle durumlarda tartım hatası seyreltme sıvısı miktarının değiştirilmesi ile ortadan kaldırılır. Standart çalışmada 10 gram gıda üzerine 90 mL seyreltme sıvısı konulmalıdır. Tartım sonucunda gıda 10,5 gram olarak tartıldı ise, seyreltme sıvısı 90 mL yerine 94,5 mL olarak alınır ve yine standart 1:10 oranı elde edilir. 90 mL olarak hazırlanmış seyreltme sıvısının üzerine pipet ile 4,5 mL steril (yedek) seyreltme sıvısı eklemek, gıdayı tam olarak 10,0 gram olarak tartmaktan çok daha kolay ve hızlıdır. Ayrıca tartım sırasında kontaminasyon olasılığı azaltılmış olur.

Bu uygulamanın hedeflenen ağırlıkta daha fazla tartımlar için geçerli olduğu ve elden geldiğince %5'ten daha fazla tartım yapılmaması gerektiği unutulmamalıdır. *Salmonella* vb. mikroorganizmaların var/yok testlerinde 25 g yerine 26 g tartıldı ise, 225 mL ön zenginleştirme besiyeri kullanmak yerine 234 (= 225 + 9) mL besiyeri kullanmak zorunlu koşul değildir. Çünkü burada yapılan, 25 g gıda + 225 mL besiyeri kullanımı bir seyreltme değil, genel olarak 1 gram gıda için 9 mL besiyeri kullanılmasıdır. Bu konuda $\pm$ %5 tolerans her zaman kabul edilir. Bu örnekteki sapma sadece %4'tür.

Burada verilen genel kurallar ile bir sonraki bölümde verilen açıklamalar, başta ISO 7218, ISO 6887 ve FDA olmak üzere uluslararası kontrol kuruluşlarından derlenmiştir. Bunlardan, "ISO 7218 TS 7894 sayılı Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi- Mikrobiyolojik Muayeneler İçin Genel Kurallar" ve "ISO 6887 TS 6235 sayılı Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi- Deney Numunelerinin Başlangıç Süspansiyonunun ve Ondalık Seyreltilerinin Hazırlanması İçin Genel Kurallar" adlı yayınlar, Türk Standartları Enstitüsü'nden sağlanmalı ve Türkçe kaynak olarak laboratuvarında bulundurulmalıdır.

05.02. Homojenizasyon

Genellikle katı ve yarı katı gıdaların bir homojenizasyon çözeltisi içinde homojen hale getirilme işlemidir. Sıvı gıdalar zaten homojen bir dağılım gösterir. Burada homojenlikten kasıt, gıdadaki mikroorganizmaların analiz yapılacak tüm kütleye homojen olarak dağıtılmasıdır.

Homojenizasyon işlemi ister sayım, ister var/yok testleri amacıyla kullanılsın, genel olarak 1:9 oranında yapılır. Buna göre 1 kısım gıda 9 kısım çözelti ile homojenize edilir. Var/yok testlerinde ise, 1 kısım gıda 9 kısım besiyeri ile homojenizasyon işlemine alınır. Sayım yapılacak ise 1:9 oranında homojenizasyon, aynı zamanda 10^{-1} seyreltme olarak da kullanılır. Bu nedenle homojenizasyonda gıda ve homojenizasyon çözeltisinin miktarına özen gösterilmelidir.

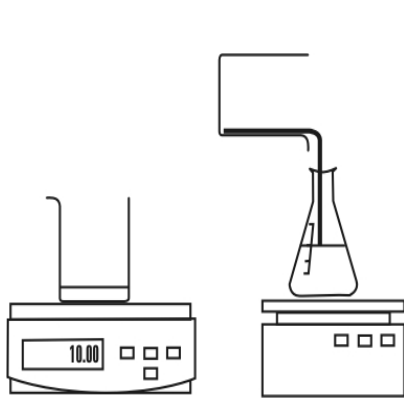
Seyreltme işlemi ise genellikle katı besiyerinde koloni sayımı ve EMS yöntemi ile sayım gibi analizlerde uygulanmaktadır (bakınız; 06. ve 07. Bölüm). Basit bir örnek ile, analiz edilecek katı gıdada 10^5 kob/g düzeyinde toplam bakteri tahmin ediliyorsa (ya da standart bu sayıya izin veriyorsa) homojenizasyon ile 10^{-1} seyrelti elde edilir. Buradan bir Petri kutusuna 1 mL aktarılıp, üzerine agarlı besiyeri dökülürse inkübasyon sonunda 10.000 koloni oluşacaktır ve 9 cm çaplı Petri kutusunda bunun sayılması mümkün değildir. Yayma yöntemi ile sayımda ise, Petri kutusuna 0,1 mL homojenizat (10^{-1} seyrelti) aktarıldığında oluşacak koloni sayısı 1.000 adettir ve bu, halen sayılamayacak kadar yüksek bir değerdir.

İdeal olarak Petri kutusunda 100 koloni gelişmesi istenir. Bu durumda dökme yöntemi ile çalışılacaksa seyreltmenin 10^{-3} düzeyine kadar gitmesi gerekir. Bu seyreltiden 1 mL alındığında aslında, orijinal örnekten 0,001 g gıda maddesi Petri kutusuna homojen bir şekilde aktarılmış olur. Buna göre 1 g gıdada 100.000 bakteri varsa, 0,001 gramında 100 bakteri olacaktır. Kuşkusuz, bu işlem tersinden gidilerek uygulanır. Amaç, analiz edilen gıdadaki mikroorganizma sayısını öğrenmektir. 1000 kez seyreltilmiş örnekten yapılan analizde 85 koloni varsa, orijinal gıdada bulunan sayı basit orantı ile 85.000 kob/g olarak hesaplanır.

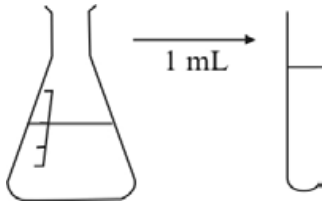
E. coli O157:H7 analizi sırasında zenginleştirme kültüründen katı besiyerine ekim yapılırken de seyreltme uygulanır. Burada amaç, Petri kutusunda rahatlıkla izole edilecek kolonileri elde etmektir.

Seyreltme tekniği ve gerekliliği aşağıda şematik olarak özetlenmiştir.

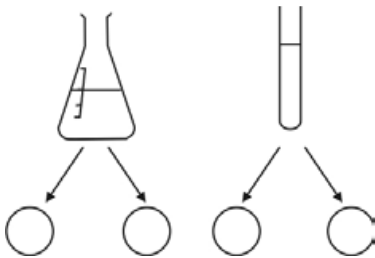
Şekil 08. Seyreltme Tekniği ile Ekim



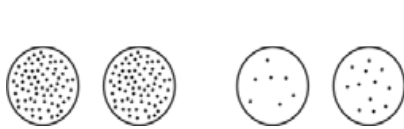
10 g gıda maddesi 90 mL seyreltme çözeltisi içinde homojenize edilir. Gıdanın her gramında "A" sayıda bakteri olduğu kabul edilirse 10 g gıda ile erlene "10A" sayıda bakteri gelmiştir. 90 g (mL) seyreltme çözeltisi ile birlikte toplam miktar 100 g (mL) olur, ancak seyreltme sıvısı steril olduğu için, buradan bakteri gelmez. Sonuçta, toplam 100 g çözeltide yine "10A" sayıda bakteri vardır. Dolayısı ile bunun 1 mL'sinde bulunan bakteri sayısı $10A / 100 = 0,1A$ olacaktır. Erlendeki çözelti orijinal örneğe göre 10 kez seyreltilmiştir ve 10^{-1} olarak ifade edilir.



İşlem, bu çözeltiden 1 mL alınıp, içinde 9 mL seyreltme çözeltisi olan tüpe aktarım ile devam eder. Aynı şekilde tüpteki bakteri sayısı erlene göre 10, orijinal gıdaya göre 100 kez seyrelmiş olur ve her mL'sinde 0,01A bakteri vardır. 10^{-2} olarak gösterilir.



Erlendeki ve tüpteki seyreltilerden ayrı ayrı olmak üzere Petri kutularına 1'er mL aktarılır. Petri kutularına geçen bakteri sayısı sırası ile 0,1A ve 0,01A şeklindedir. Diğer bir deyiş ile, Petri kutularına sırası ile 0,1 g ve 0,01 g gıda maddesi aktarılmış olur. Standart uygulamada her seyreltiden 2'şer Petri kutusuna ekim yapılır. Petri kutuları inkübasyona bırakılır.



İnkübasyon sonunda erlenden yapılan ekimde, Petri kutularındaki koloni sayısı, tüptekinin 10 misli fazladır. Koloniler sayılarak gıda örneğindeki bakteri sayısı hesaplanır (bakınız; 07.01.04. Bölüm)

Sıvı gıdadan Petri kutularında sayılabilecek kadar koloni gelişmesi bekleniyor ise homojenizasyon yapılmadan doğrudan ekim yapılır. Çiğ süt gibi yüksek sayıda bakteri olan ürünlerde seyreltme zorunludur (bakınız; 06.01.01. Bölüm).

05.02.01. Homojenizatörler

Analiz edilecek gıdaya ve laboratuvar olanaklarına göre blender ya da stomacher kullanılmalıdır. Blender, mutfak tiplerinde olduğu gibi dönen bıçakları ile katı gıdayı kullanılan çözelti içinde homojen hale getirir.

Stomacher ise özel torbaları içinde pedalları sayesinde bir anlamda gıdayı ezerek homojenizasyon sağlar.

Ketçap ve yoğurt gibi yarı katı gıdaların analizinde homojenizatör olarak manyetik karıştırıcı da kullanılabilir.

05.02.02. Homojenizasyon ve Seyreltme Çözeltileri

Genel amaçlı seyreltme çözeltisi olarak "Serum Fizyolojik" (%0,85 NaCl; Merck 1.06404) yaygın kullanım alanı bulmuşsa da, bugün ISO 6887'ye göre formülü Serum Fizyolojik (%0,85) + Pepton (%0,1) olan "Maximum Recovery Diluent" (Merck 1.12535) kullanılmaktadır. Bu çözelti "pepton-tuz (saline-peptone)" olarak da anılmaktadır. Yine ISO 6887'ye göre %0,1 pepton çözeltisi (Merck 1.07214) ile *Salmonella* analizinde kullanılan "Tamponlanmış Peptonlu Su" (Merck 1.07228) seyreltme amacı ile kullanılmaktadır.

Başta peynirler olmak üzere süt ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde, seyreltme sıvısı olarak ¼ kuvvetinde Ringer çözeltisi (Merck 1.15525) kullanılmalıdır. Süt ürünleri dışında Ringer çözeltisi kullanmak gerekli değildir. Peynirlerde %2 sodyum sitrat çözeltisi, ISO 6887'de seyreltme çözeltisi olarak verilmektedir.

Reçel, meyve suyu konsantresi gibi yüksek şekerli gıdalardaki ozmofilik-ozmotolerant mayaların sayımında %20 glikoz çözeltisi ilk ve daha sonraki seyreltmelerde kullanılır. Anaerobların analizinde oksijeni bağlayan özel seyreltme çözeltisi kullanılması gerekmektedir. Halofil bakteriler ve *Vibrio* türleri vb. gibi özel grupların analizinde de özel seyreltme çözeltiler kullanılmaktadır.

Yağ oranı yüksek örneklerin homojenizasyonu için Tween 80 (Merck 8.22187) kullanılabilir. Bu amaçla seyreltme sıvısı içine (sterilizasyon öncesinde) %1 oranında Tween 80 katılması, özellikle krema gibi çok yağlı süt ürünleri için önerilmektedir.

Benzer şekilde, mayonez için Triton X 100'ün (Merck 1.08603) %1'lik çözeltisinden 90 mL'ye 1 mL ilavesi ile daha iyi bir homojenizasyon sağlanmaktadır. Bu çözeltilerin dışında daha pek çok çözelti de özel amaçlarla kullanılabilir.

Seyreltme çözeltileri her 6 ayda bir toksik maddelerin varlığı açısından kontrol edilmelidir. Basit olarak, sayım sonucunun sağlıklı olarak alınacağı (yaklaşık 100 kob/Petri) seyreltiden, seyreltme yapıldıktan 0, 15, 30, 45 dakika sonra tercihen PCA'ya ekim yapılır. Bu amaçla çiğ süt kullanılabilir ve gerekirse birden fazla seyreltiden ekim yapılabilir. Eğer, 45. dakika sayımları 0. dakika sayımlarına oranla %20'den daha az ise; bunun nedeni saptanıp, düzeltici işlem uygulanır ve tekrar test edilir. Bununla ilgili kayıtlar tutulmalıdır.

05.02.03. Homojenizasyon ve Seyreltme İşlemi

Gıdanın çeşidine göre değişmek üzere gıdada homojenizasyon ve/veya seyreltme yapılması gerekebilir. Sıvı ya da yoğurt, şeker, dondurma, tuz, süt tozu gibi suda kolaylıkla eriyen gıdalar için herhangi bir ön hazırlığa gerek yoktur. Bu gıdalar seyreltme sıvısı içinde basit bir mekanik karıştırma ile homojenize edilebilir.

Tereyağı homojenizasyonunda kullanılan çözeltiler 30–32 °C'da olmalıdır. Pipetleme sırasında pipetin içinde tereyağının katılaşmasını önlemek için pipet birkaç kez alevden geçirilerek ısıtılır.

Baharat örnekleri için ilave steril tüpe ihtiyaç vardır. Bisküvi, makarna gibi kuru gıdalar ile peynirler blender kullanılarak, et ürünleri ise tercihen stomacher kullanılarak homojenize edilir.

Homojenizasyon (ilk seyreltme) ve sonraki seyreltmeler, standart olarak 1:9 oranında yapılır. Bunun için başlangıçta 10 g gıda örneği 90 mL seyreltme çözeltisi ile homojenize edilir. *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 serotipi ve *Listeria* analizinde ise 25 g gıda 225 mL besiyerine ilave edilir.

Bu uygulamada seyreltme amacı yoktur, sadece gıda için yeterli miktarda besiyeri kullanılmaktadır. 11 g numunenin 99 mL seyreltme çözeltisinde homojenize edilmesi de uygulanan bir yöntemdir.

Seyreltmenin 1:9 oranında yapılmasının nedeni hesap kolaylığı içindir. Petri kutusunda sayılan koloni basit olarak seyreltme faktörü ile çarpılır. Bu faktör, 1:9 oranı kullanıldığında 10, 100, 1000 gibi bir değerdir. 1:99 oranında seyreltme kullanılarak doğrudan 100 kez seyreltme de yapılabilir. Aşağıda açıklanacağı gibi katı (agarlı) besiyeri kullanımlarında ve En Muhtemel Sayı yönteminde de ilk seyreltmenin 1:9 oranında yapılması zorunlu değildir.

Un, hazır çorba ve kuru maydanoz gibi gıdalar 1:9 oranında homojenize edilemez. Bu oranda işlem yapıldığında un ve hazır çorba pıhtılaşır, kuru maydanoz mevcut suyu tutar. Bu nedenle ilk seyreltme 1:19 oranında yapılır.

Örnek: Unda toplam mezofil aerob bakteri sayımı için ilk seyreltme 1:19 oranında yapılmış, bu kısım sanki ayrı bir sıvı gıda örneği gibi düşünülüp, buradan standart 1:9 oranında seyreltme yapılmış, yayma yöntemi ile ekim ve inkübasyon sonunda 10^{-2} seyreltide 219 ve 185, 10^{-3} seyreltide 28 ve 18 koloni sayılmıştır. Yukarıdaki örneğe göre "ayrı bir örnek olarak düşünülen" un çözeltisinde bulunan bakteri sayısı $2,1 \times 10^5$ kob/mL'dir. Bu değer 20 ile çarpılarak un örneğinde $4,2 \times 10^6$ kob/g bakteri olduğu hesaplanır. Hesaplama yöntemi 07.01.04. Bölümde verilmiştir. EMS yönteminde de aynı yaklaşım söz konusudur (bakınız; 07.02.04. Bölüm).

Kuru gıdalarda erimeyi kolaylaştırmak için ilk seyreltmenin yapılacağı erlene (sterilizasyon öncesinde) yaklaşık 6 mm çaplı cam boncuk atılması önerilmektedir. Cam boncuk kullanılması, hardal, fındık ezmesi ürünleri, krema vb. gibi kolay erimeyen gıdalar için de önerilir.

Yine kuru gıdaların homojenizasyonunda -özellikle Gram negatif bakterileri ozmotik şoktan korumak için- kademeli homojenizasyon önerilmektedir. Bu amaçla, steril bir erlene 10 gram örnek alınıp, üzerine 10 mL kadar seyreltme çözeltisi ilave edilir ve elle karıştırılarak yeterli ıslanma sağlanır. Sonra seyreltme çözeltisinin kalan kısmı ilave edilir.

Sayımı yapılacak bakteri sayısı çok az olarak bekleniyor ve şeker, yoğurt, süt tozu gibi suda kolaylıkla eriyen bir katı ya da yarı katı gıda kullanılıyor ise, ilk seyreltme 1:4 oranında da yapılabilir.

Örnek: Süt tozunda *Staphylococcus aureus* sayımı için 10 gram örnek 40 mL seyreltme çözeltisi ile homojenize edilmiş, 3 adet Baird Parker Agar besiyerine buradan alınan 1 mL eşit şekilde aktarılmış ve yayılmış, inkübasyon sonunda Petri kutularında sırası ile 3, 1, 2 adet *S. aureus* sayılmıştır. Buna göre süt tozu çözeltisinde 6 kob/mL sayıda *S. aureus* vardır. Bu değer 5 ile çarpılarak süt tozu örneğinde 30 kob/g *S. aureus* olarak sonuç verilir.

Standart analizlerde manyet ile birlikte sterilize edilmiş 90 mL seyreltme sıvısına aseptik koşullarda tartılmış 10 gram gıda maddesi ilave edilir ve manyetik karıştırıcıda orta devirde yaklaşık 1 dakika tutulup homojenizasyon sağlanır.

Bazı gıdalar seyreltme sıvısında bu yöntemle kolaylıkla homojenize edilemez. Bu durumda ya stomacher ya da blender kullanılmalıdır. Her iki koşulda da ilk seyreltme 225 mL seyreltme sıvısına 25 gram gıda ilavesi ile yapılır.

Blender kullanımında ilave 250 mL boş bir steril erlen bulundurulmalı, 25 gram gıda ile seyreltme sıvısından 150 mL kadar kısım blenderde homojenize edilip, boş steril erlene aktarılmalı, seyreltme sıvısından arta kalan kısım ile blender çalkalanmalı ve erlene ilave edilmelidir.

İlk seyrelti (10^{-1}) yapıldıktan sonra 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltilere yine aynı seyreltme çözeltisi ile devam edilir. Standart gıda analizlerinde daha fazla seyreltmeye gerek yoktur. Bu seyreltmeler steril 1 mL'lik pipet kullanılarak standart şekilde yapılır. Bu amaçla erlenenden 1 mL alınıp, 9 mL seyreltme sıvısına aktarılır ve tüp karıştırıcıda karıştırılır. Bu şekilde 10^{-2} seyrelti elde edilir. Buradan bir başka steril pipet ile 1 mL alınıp diğer tüpe aktarılır ve yine mekanik tüp karıştırıcıda karıştırılır. Bu tüp ise 10^{-3} seyreltidir.

Analiz edilecek gıda maddesi (örneğin baharat) suda tam olarak erimiyor ise ilk seyreltinin (10^{-1}) yapıldığı erlen kendi halinde oda sıcaklığında 5 dakika bırakılır. Sonra steril bir 10 mL pipet ile sıvının üst tarafından 10 mL çekilip, steril bir tüpe aktarılır. Böylece daha sonraki pipetlemelerde pipetin gıda partikülleri ile tıkanması önlenmiş olur.

Eğer *Clostridium perfringens* ve/veya sülfid indirgeyen anaerob bakteri sayımı da yapılacak ise; özellikle homojenizasyon sırasında gıdanın aşırı miktarda hava (oksijen) ile teması, sahte negatif ya da gerçekte olduğundan daha az sayıda sonuç alınmasına neden olur. Bu koşulda eğer analiz edilecek gıda seyreltme sıvısında basit bir karıştırma ile homojenize edilemiyorsa, ilk seyreltinin blenderde yapılması önerilmez, stomacher kullanılmalıdır.

Bu tip analizlerde bir başka homojenizasyon yöntemi, gıdayı kum ile ezmektir. İçinde steril kum ve seyreltme çözeltisi bulunan laboratuvar tipi porselen havanlarda gıda ezilerek ilk seyrelti yapılır. Sonra havan kendi halinde 5–10 dakika tutularak, kum ve katı parçacıkların çökmesi beklenir ve yukarıda açıklandığı şekilde steril bir pipet ile 10 mL alınıp, steril bir boş tüpe aktarılır. Peynir gibi gıdalar için kullanılabilen bu uygulamada seyreltme çözeltisinin tamamı havana konulursa iyi bir ezme yapılmayabilir. Bu nedenle, önce seyreltme çözeltisinden yeteri kadar kısım havana ilave edilir, homojenizasyon bittikten sonra çözeltinin kalan kısmı da eklenir ve karıştırılır.

Gıda mikrobiyolojisinde gerekli olmamakla beraber, zorunlu anaerob bakterilerin analizinde özel seyreltme çözeltileri kullanılmaktadır.

Seyreltme işlemi yapıldıktan sonra tercihen 15 dakika içinde ekim işlemi bitirilmiş olmalıdır. Bu süre uzarsa, koliformlar gibi hızlı çoğalan bakteriler sayılarını artırabilir. Homojenizasyon aşamasından itibaren ekime kadar geçen süre en çok 30 dakika olarak verilmektedir.

Eğer ekim öncesinde bir canlandırma işlemi yapılacaksa, burada verilen süre geçerli değildir. İlgili talimatta canlandırma işleminin ne kadar süre ile yapılacağı belirtilmelidir.

06. Ekim ve İnkübasyon

06.01. Ekim	85
06.01.01. Ekim için Seyrelti Seçimi	85
06.01.02. Ekim İşlemi	87
06.02. İnkübasyon	88

06.01. Ekim

06.01.01. Ekim İçin Seyrelti Seçimi

Ekim yöntemi ile gıda maddesindeki olası mikroorganizma sayısı ya da kalite standartlarına göre hangi seyreltilerden ekim yapılacağına karar verilir.

Çoğu gıdada *Staphylococcus aureus* sayısının 1 g (mL)'da 10'dan daha az olması istenir. Bu durumda sıvı gıda doğrudan, katı gıda 10^{-1} seyreltiden 3 adet Baird Parker besiyerine 1 mL olarak yayma yöntemi ile ekilir. İnkübasyon sonunda toplam olarak sıvı gıdada 10'dan daha az sayıda (örneğin 6 koloni) bulunması standarda uyulduğunu gösterir.

Katı gıda 10^{-1} seyreltiden ekildiğine göre 3 Petri kutusu toplamında 1 koloni bile olmamalıdır. Gerçekte katı gıdada 6 kob/g düzeyinde *S. aureus* olduğu var sayılırsa, toplam 1 mL ekim ile %60 olasılıkla 3 Petri toplamında 1 koloni oluşacak ve sonuç 10 kob/g olarak verilecek, bir diğer deyiş ile gerçekte standart içinde kalınmakla birlikte, ürün standart kalite dışında olarak değerlendirilecektir.

Bu gibi nedenlerle düşük sayılarda bulunan ya da bulunmasına izin verilen mikroorganizmaların analizinde En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemi kullanılması gerekmektedir.

Bir gıda maddesinde toplam bakteri sayımında izin verilen değerin 10^5 kob/g olduğu kabul edilir ise; PCA besiyerine 10^{-2} seyreltiden 0,1 mL aktarılıp, inkübasyon sonunda 100 koloni sayılırsa bu değer 10^5 kob/g olacaktır. Buna göre sadece 10^{-2} seyreltiden yayma yöntemi ile ekim yapılsa ve inkübasyon sonunda koloni sayısının 100'den az ya da çok olması dikkate alınsa yeterlidir. Petri kutusunda 100 koloni sayımı çok kolaylıkla yapılabilir ve sayımda bu değer istatistik olarak da benimsenir.

İzin verilen ya da işletme kalite standardına göre belirlenen sayı 10.000 kob/g ise, yukarıdaki örneğe göre sadece 10^{-1} seyreltiden yayma yöntemi ile ekim yapılması yeterli olur.

Hedef sayı 1.000 ise sıvı gıdadan doğrudan, katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden yayma yöntemi ile ekim yeterlidir. Bu uygulamada inkübasyon sonrasında Petri kutusunda sıvı gıdada 100, katı gıdada 10 koloni olacağı, 10 koloni sayımında ise 07.01.04. Bölümde verildiği gibi %95 güvenlik sınırları çerçevesinde gerçek değer bundan daha az ya da daha fazla olabileceği dikkate alınmalıdır. Bu nedenle, hedef sayı 10.000 kob/g olduğunda, 10^{-2} seyreltiden ekim ve Petri kutusunda 10 koloni sayılması benimsenmez.

Basit bir yıkama dahil olmak üzere minimal işlem görmüş gıda maddelerinde 10^5 ya da 10^6 kob/g genelde izin verilen üst sınırdır. Aşağıda sıvı ve katı gıdalara göre hedef sayı ile ekim yöntemi ve seyreltme seçimi kuralları verilmiştir.

-Hedef sayı 100.000 kob/g (mL) ise, sıvı ve katı gıdanın 10^{-2} seyreltisinden yayma yöntemi ile ekim yapılır.

-Hedef sayı 10.000 kob/g (mL) ise, sıvı ve katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden yayma yöntemi ile ekim yapılır.

-Hedef sayı 1.000 kob/g (mL) ise, sıvı gıdadan doğrudan (10^0) yayma yöntemi ile, katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden dökme yöntemi ile ekim yapılır. Katı gıdada yayma yöntemi ile ekimde oluşacak 10 koloni sayısı güvenilir değildir.

-Hedef sayı 100 kob/mL ise, sıvı gıdadan doğrudan (10^0) yayma yöntemi ile ekim yapıldığında Petri kutusundaki 10 koloni sayısı güvenli değildir. Dökme yöntemi tercih edilmelidir. Katı gıdada 10^{-1} seyreltme zorunludur. Hedef sayı 100 kob/g ise, 10^{-1} seyreltiden dökme ekim yapıldığında Petri kutusundaki 10 koloni sayısı güvenli değildir. EMS yöntemi tercih edilmelidir.

-Hedef sayı 10 kob/mL ise, sıvı gıdadan doğrudan (10^0) dökme ekim yapıldığında Petri kutusundaki 10 koloni sayısı güvenli değildir. EMS yöntemi tercih edilmelidir. Katı gıdada 10^{-1} seyreltme zorunludur. Hedef sayı 10 kob/g ise 10^{-1} seyreltiden dökme ya da 3 Petri kutusuna 1 mL yayma yöntemi ile sadece 1 koloninin olup olmadığı incelenebilir. İlk seyreltiden 10'ar mL şeklinde EMS yöntemi uygulanmalıdır (bakınız; 07.02. Bölüm).

-Hedef sayı 1 kob/mL ise, dökme ya da 3 Petri kutusuna 1 mL yayma yöntemi ile sadece 1 koloninin olup olmadığı incelenebilir. İlk seyreltiden 10'ar mL şeklinde EMS yöntemi uygulanmalıdır. Membran filtrasyon yöntemi de önerilebilir. Hedef sayı 1 kob/g ise, katı gıdada pratik olarak sayım yapılamaz. Suda tam çözünebilen gıdalarda membran filtrasyon ile sayım yapılabilir.

Bu örneklerden görüldüğü gibi, düşük sayılarda beklenen mikroorganizma varlığında ekim yönteminde farklı seçenekler ortaya çıkmaktadır. Prensip olarak, öncelikle katı besiyeri kullanılmalı, daha düşük sayılarda EMS yöntemi tercih edilmeli ve EMS ile sağlıklı şekilde sonuç alınamayacak durumlarda membran filtrasyon yöntemi tercih edilmelidir.

06.01.02. Ekim İşlemi

Ekimlerde dikkate alınacak hususlar aşağıda verilmiştir:

-Seyreltme işlemi bitirildikten sonra hızla ekim yapılmalıdır. Bu amaçla bir örneğin ekimi tümüyle bitirildikten sonra bir diğerinin seyreltme işlemine başlanılmalıdır.

-Petri kutularının homojenizasyona başlamadan önce yazılmış olması işlem sırasında gereksiz beklemlerin önüne geçer.

-Her seyreltiden 2 Petri kutusuna paralel ekim yapılması gereklidir.

-Ekim sırasında numunenin kontaminasyonu kesinlikle önlenmeli, benzer şekilde *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 serotipi ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenler ile çalışılırken zenginleştirme örneklerinden yapılan ekimlerde, bu kültürlerin laboratuvar personeline bulaşmamasına dikkat edilmelidir.

-EMS ekimlerinde 5 mL pipet kullanılarak 3 tüpe 1'er mL aktarılması pratik, ancak el deneyimi gerektiren bir uygulamadır.

-Petri kutusuna yapılacak ekimlerde örnek ile ilgili bilgilerin kapağa yazılması, kapakların karışması olasılığı nedeniyle sakıncalıdır. Petri kutularında yazımlar tabana yapılmalıdır. Tabandaki yazılar koloni incelemesini engellememelidir. Bu amaçla ince uçlu kalemler tercih edilmelidir. Yazımlar en az düzeyde, ancak ekim yapılmış Petri kutusundaki örnek hakkında hiçbir karışıklığa yol açmayacak kadar fazla olmalıdır. Özellikle yoğun ekim yapılan laboratuvarlarda Petri kutularının yazımında standardizasyon, çok daha fazla önemlidir.

-Homojenizasyona başlanırken, tezgah üzerinde Plate Count Agar dökülmüş bir adet Petri kutusunun kapağı tam açık olarak tutulmalı, bu Petri kutusu da tarih ve açık kaldığı süre kaydedilerek inkübasyona bırakılmalıdır. Çalışma atmosferinden (havadan) gelebilecek kontaminasyonu belirlemek için yapılan bu çalışmada, Petri kutusunda 1 koloni/dakika izin verilebilen en yüksek kontaminasyon düzeyidir. Bundan daha fazla kontaminasyon görülürse, düzeltici faaliyet uygulanmalıdır. Gıda analizinde maya-küf sayımı yapılıyor ise, kullanılan besiyerinden bir adedi aynı şekilde açık bırakılmalıdır. Bunun değerlendirmesi PCA gibidir.

-Her ekimde her besiyeri için bir adet Petri kutusu kontrol olarak bırakılmalıdır. Analizin durumuna göre eğer homojenizasyon ve seyreltme uygulanıyorsa, bu çözeltilerin de sterilite testi PCA besiyerinde yapılmalıdır. Tersine olarak, seyreltme çözeltilerinin toksik özellik göstermediği de kontrol edilmelidir (bakınız; 05.02.02. Bölüm).

-Yayma yöntemi kullanılıyor ise Drigalski spatüllerinin sterilize edildiği alkolden de sterilite testi için yine PCA besiyerine ekim yapılmalıdır. Bu uygulama yöntemi 04.05. Bölümde verilmiştir.

06.02. İnkübasyon

İnkübasyonda dikkat edilecek noktalar aşağıda açıklanmıştır.

-Belirtilen inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile anaeroblar için özel gaz atmosferine uyulmalıdır.

-İnkübatör sıcaklığı minimum–maksimum termometre ile kontrol edilmelidir.

-Özellikle 37 °C ve daha yukarıdaki sıcaklıklarda yapılan inkübasyonlarda, Petri kutuları tabanları üstte, kapakları altta olacak şekilde (ters çevrilerek) inkübatöre konulması gerekir. Yine bu sıcaklık derecelerindeki inkübasyonlarda, eğer süre 24 saatten fazla olacak ise, basit olarak içinde su olan bir beher inkübatöre konulur. Böylece, Petri kutularında yüzey kuruması önlenmiş olur.



Tabanı üzerine



Kapağı üzerine

Petri kutularının mutfak tipi strech filme sarılarak ya da basitçe naylon torba içinde inkübasyonu kurumayı kayda değer ölçüde önler. Bu uygulama, 45 °C'da inkübe edilen *Alicyclobacillus* spp. gibi termofillerin analizinde çok daha fazla gereklilik gösterir. Fekal koliform bakteri analizinde olduğu gibi (bakınız; 10.03. Bölüm) dökme yöntemi ile çalışılıyorsa Petri kutusundaki örnek üzerine 15 mL kadar VRB Agar dökülmesi, 2. kat olarak 7–8 mL kadar besiyeri dökülmesi ile kuruma önemli ölçüde engellenir.

-Membran filtrasyon uygulamalarında ise, Petri kutularının kapakları üstte, tabanları altta olacak şekilde (düz şekilde) inkübatöre konulması uygundur.

-Basit olarak, Petri kutusu tartılır (dara), üzerine 12–14 mL kadar PCA dökülür ve bir kez daha tartılır. İnkübasyon sonunda bu Petri kutusu bir kez daha tartılır. Dara düşüldükten sonra inkübasyon öncesine göre %15 ağırlık kaybı, izin verilen en üst ağırlık kaybı oranıdır. Daha fazla ağırlık kaybı varsa düzeltici işlem uygulaması yapılmalıdır. İzin verilen bu oran VRB gibi selektif besiyerlerinde daha azdır. Ağırlık kaybı fazla ise, düzeltici işlem olarak daha fazla besiyeri dökülmesi ve plastik Petri kutusu kullanılması da gündeme gelebilir. Bu gibi düzeltici önlemler analiz talimatlarına kayıt edilmelidir.

-İnkübatörde 6'dan daha fazla cam Petri kutusunun üst üste konulmamasına özen gösterilmelidir. Bu değer plastik Petri kutularında 8'dir. Bazı kaynaklarda plastik kutular için de bu değer 6 olarak verilmektedir.

-İnkübatörde sıcaklık değişimlerinin en aza indirilmesi için kapağın gereksiz yere açılmamasına özen gösterilmelidir.

-Hem Petri kutuları arasında hem inkübatörün duvarları arasında 2,5 cm boşluk bırakılması gerekmektedir. Bu şekilde inkübatör içinde ısı dağılımı düzenli olur.

07. Mikroorganizma Analiz Yöntemleri *

07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler	89
07.01.01. Genel Bilgiler	89
07.01.02. Dökme Yöntemi	94
07.01.03. Yayma Yöntemi	94
07.01.04. Koloni Sayısının Hesaplanması	95
07.01.05. İdentifikasyon Esaslı Sayım ve Doğrulama	98
07.01.06. Sonuçların Verilmesi	99
07.02. En Muhtemel Sayı Yöntemi	100
07.02.01. Genel Bilgiler	100
07.02.02. EMS Yönteminin Uygulanışı	105
07.02.03. Tüplerin Değerlendirme Kuralları	107
07.02.04. EMS Yönteminde Sonuçların Verilmesi	108
07.03. Membran Filtrasyon	109
07.03.01. Genel Bilgiler	109
07.03.02. Membran Filtrasyon Yönteminin Uygulanışı	111
07.03.03. Membran Filtrasyon Yönteminde Sonuçların Verilişi	112
07.04. Titre Belirlenmesi	112
07.05. Metabolizmaya Dayalı Hızlı Analizler	113
07.06. Mikroskopik Sayımlar	115
07.06.01. Breed Yöntemi	115
07.06.02. Howard Lamı	116
07.06.03. Thoma Lamı	117
07.06.04. Direk Epifloresan Filtre Tekniği	118
07.07. Canlandırma	118
07.08. Var/Yok Testleri	120
07.09. Biyolojik Stabilite Testi	121
07.10. Yüzey ve Hava Kontrolü	122
07.11. Sonuçların Yorumlanması	123

07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler

07.01.01. Genel Bilgiler

Katı besiyeri kullanılarak yapılan sayımın prensibi "her canlı hücrenin belirli bir inkübasyon sonunda 1 adet koloni oluşturması"dır. Bununla birlikte, canlı olduğu halde hasar görmüş ve gelişip koloni oluşturamayacak canlı hücreler de gıda maddesinde bulunabilir. Bu nedenle sayım sonuçları "sadece koloni oluşturabilenlerin" sayıldığını göstermek üzere "koloni oluşturan birim; kob (colony forming unit; cfu)" olarak verilmektedir. Katı besiyeri kullanılan standart yöntemler dökme, yayma ve damlatma olarak üç ana grupta ele alınır.

* Bu bölüm, Prof. Dr. A. Kadir Halkman tarafından yazılmıştır.

Bunlardan dökme yönteminin uygulanışında, steril Petri kutusuna analizi yapılacak sıvı gıda maddesinden doğrudan ya da uygun seyreltisinden 1 mL aktarılıp, üzerine donma sıcaklığının biraz üzerinde (yaklaşık 45 °C) agarlı besiyeri dökülür ve karıştırılır. Agar donunca Petri kutusu inkübasyona bırakılır.

Yayma yönteminde ise, Petri kutusuna önce agarlı besiyeri dökülür, katılaştıktan sonra sıvı gıda maddesinden doğrudan ya da uygun seyreltisinden 0,1 mL aktarılıp, "Drigalski spatülü" olarak adlandırılan cam çubuk ile yayılır. Drigalski spatülünün metal ya da tek kullanımlık olanları da vardır. Gıdadaki mikroorganizma sayısı bu yöntemin kullanılabileceği kadar yüksek ise, dökme yöntemine tercih edilmelidir. Bu konuda, analiz edilecek gıdadaki mikroorganizma sayısı bağlayıcı olmakla beraber, laboratuvarın tercihleri de önemlidir.

Şekil 09.
Drigalski Spatülü



Damlatma yönteminde, daha önceden dökülüp katılaşmış besiyerine 10 µL (0,01 mL) damlatılır ve kendi halinde kurumaya bırakılır. Potato Dextrose Agar gibi besiyerleri damlayı çok iyi emdiği için, 50 µL damlatma yapılabilir. Kuruma sırasında yaklaşık 2 cm çaplı bir daire içinde oluşan koloniler genellikle büyüteç altında sayılır. Bu yöntemin en büyük avantajı tek Petri kutusu üzerine 4–6 damla aktarılması, diğer bir deyiş ile, besiyerinden 4–6 misli tasarruftur. Ancak, kolonilerin sağlıklı bir şekilde sayılamaması nedeni ile hiçbir koşulda günlük analizde kullanılmaz. Zorunlu hallerde titre belirlenmesi için kullanılabilir.

Dökme ve yayma yönteminin kıyaslanmasında her iki yöntemin de birbirlerine göre üstünlükleri olduğu görülür:

-Petri kutusuna dökme yönteminde 1 mL, yayma yönteminde 0,1 mL örnek aktarıldığı için, dökme yöntemi yayma yönteminden 10 misli daha duyarlıdır. Örneğin, katı bir gıdada 10 kob/g düzeyinde *S. aureus* bulunmasına izin veriliyorsa ve o gıdada 30 kob/g *S. aureus* varsa, 10^{-1} seyreltinin 1 mL'sinde 3 adet *S. aureus* olacaktır. Dökme yönteminde 1 mL kullanıldığına göre Petri kutusunda 3 koloni oluşacak ve seyreltme faktörü ile çarpılarak 1 gramda 30 sayısına ulaşılabilecektir. Aynı örnek yayma yöntemi ile ekildiğinde 0,1 mL içinde 1 adet *S. aureus* olma şansı sadece %30'dur. Buna göre inkübasyon sonunda %30 olasılıkla 1, %70 olasılıkla 0 koloni olacaktır. 1 koloni oluşur ise sonuç $(1 \times 10 / 0,1)$ hesabı ile 100 kob/g, hiç koloni oluşmazsa 1 gramda 100'den daha az olarak verilecektir. Bu örneğe göre katı gıdalarda 100 adet/g, sıvı gıdalarda 10 adet/mL'den daha az sayıda mikroorganizma varsa, yayma yöntemi uygun değildir.

-Bununla beraber, 1 mL sıvının standart 3 Petri kutusuna yayılması ve 14 cm genişliğinde büyük Petri kutusuna doğrudan 1 mL aktarılıp yayılması gibi çözümler üretilmiştir.

-Dökme yönteminde mikroorganizmalar tüm besiyeri kütesine dağılır ve buna bağlı olarak tabana yakın ve yüzeye yakın olan mikroorganizmalar oksijenden yararlanma farkı nedeni ile farklı büyüklükte ve morfolojide koloni oluşturur. Oysa yayma yönteminde tüm mikroorganizmalar yüzeyde olduğu için aynı şekilde oksijenden yararlanarak aynı büyüklükte ve morfolojide koloni oluştururlar. Bu açıdan değerlendirildiğinde yayma yöntemi avantajlıdır.

-Yaygın kullanım alanı olmamakla beraber, 10^{-1} seyreltiden 4 adet boş steril Petri kutusuna toplam 10 mL'nin dağıtılması ve üzerlerine 15'er mL kadar besiyeri dökülmesi ile fiilen 1 gram katı gıda analiz edilmiş olur.

-Dökme yönteminde agarlı besiyeri çok sıcak olursa, termal şok nedeni ile mikroorganizmaya zarar verebilir. Çok soğuk olursa, dökme sırasında besiyeri katılaşır ve iyi bir karıştırma sağlanamayabilir. Besiyeri sıcaklığı optimum olsa bile besiyeri ile çözeltinin homojen karışmasını sağlamak el deneyimi gerektirir. Buna bağlı olarak da dökme yönteminde kullanılacak agarlı besiyerleri en fazla 250 mL olarak hazırlanmalıdır. Yayma yönteminde bu gibi sorunlar yoktur, cam çubuk ile daha homojen bir dağılım sağlanır.

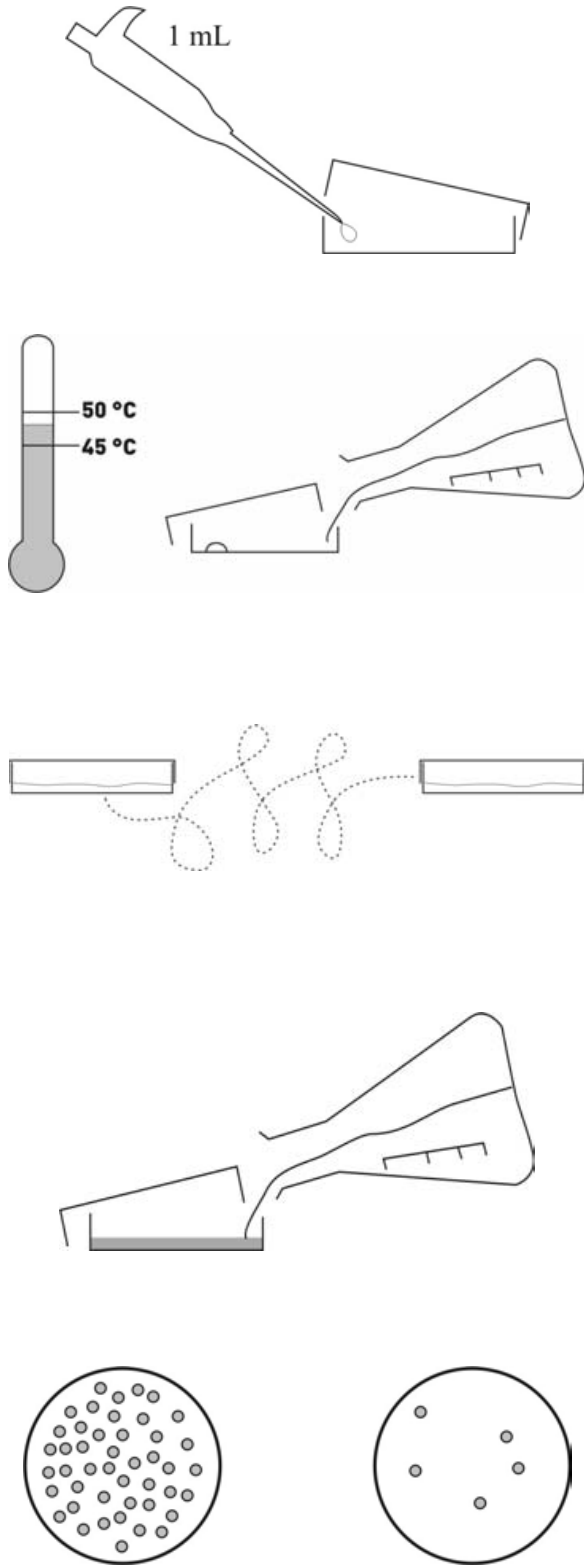
-Yayma yönteminde, besiyeri Petri kutusuna döküldükten sonra bir süre yüzeyin kurumaması beklenmelidir. Oysa dökme yönteminde böyle bir sorun yoktur. Dolayısıyla acil ekimlerde stokta önceden dökülmüş hazır besiyeri yoksa ve bu nedenle yeterince kurumamış besiyeri kullanılırsa kolonilerde yayılma oluşabilir. Yayma yönteminde, stok Petri kutularının organizasyonu kolaylıkla sağlanabilir. Dökme yönteminde ise, besiyeri sterilize edildikten sonra erlende katılaştırılıp stoklanır ise yeniden eritmek gerekir. Bu işlem, besiyerine zarar verebilir. Ayrıca her besiyeri bu şekilde yeniden eritilemez.

-Yayma yönteminde kullanılan cam (bazen metal) çubuğun sterilizasyonu alkol ile yapılmaktadır. Alkol, konsantrasyon düşmesi sonucu sterilizasyon etkisini göstermez ve kontaminasyona neden olabilir. Dökme yönteminde alkolden ya da Drigalski spatülünden gelebilecek bir kontaminasyon riski yoktur. Buna karşı, disposal steril plastik Drigalski spatülü kullanılabilir.

Bu açıklamalardan görüldüğü gibi, her iki yöntemin de birbirlerine göre üstün tarafları vardır. Genel olarak gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı günlük analizlerinde yayma yöntemi ile çalışılır. Yukarıda da belirtildiği gibi, sıvı gıdada az sayıda mikroorganizma olduğu tahmin ediliyorsa, herhangi bir seyreltme yapılmadan doğrudan analiz için kullanılır. Katı gıda mutlaka uygun bir seyreltme çözeltisinde homojenize edilmiş olmalıdır.

Yayma yönteminde 0,1 mL pipetlenmesinin nedeni, besiyerinin daha fazla hacmi emmemesi değil, sadece hesap kolaylığıdır. Böylece 0,1 mL aktarılma sonunda koloni sayısı basit olarak 10 ile çarpılarak seyreltme çözeltisinin 1 mL'sindeki sayı bulunup, seyreltme faktörü ile çarpılarak orijinal örnekteki sayı hesaplanır.

Şekil 10. Dökme Yöntemi Uygulanışı



Steril Petri kutusuna önce 1 mL örnek (sıvı gıda, homojenizatı ya da uygun bir seyreltisi) -kontaminasyon olmamasına özen gösterilerek- aktarılır. Petri kutusu tabanlarına önceden gerekli tüm bilgiler yazılmış olmalıdır. Sayım için ardışık 2 seyreltiden paralel ekim yapılır.

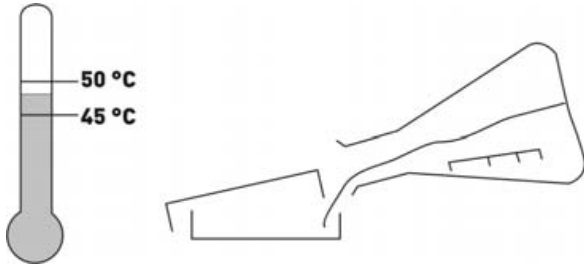
Üzerine 45–50 °C'da tutulan steril besiyerinden, en az 2 mm kalınlık oluşturacak şekilde dökülür. Standart Petri kutuları için bu miktar 12–15 mL kadardır. Besiyeri dökme sıcaklığı çok kritiktir. Daha sıcak ya da daha soğuk olmamalıdır.

Besiyeri döküldükten hemen sonra düzgün bir zeminde ve dikkatli bir şekilde 888 çizilerek Petri kutusuna aktarılmış örnek ile besiyerinin tam olarak karışması sağlanır. Petri kutuları düzgün bir zeminde kendi halinde jelleşmeye bırakılır.

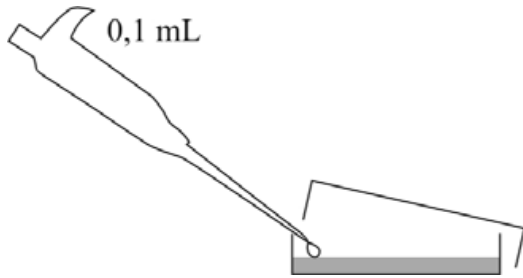
Gerekirse, 45–50 °C'da tutulan 2. kat besiyerinden 5 mL kadar dökülür ve kendi halinde jelleşmeye bırakılır. 2. kat döküm standart uygulamada yoktur, koliform grup analizi gibi bazı özel analizlerde yapılır. 2. katın da tam olarak jelleşmesi beklenir.

İnkübasyondan sonra Petri kutuları sayım, var/yok analizlerine uygun bir şekilde değerlendirilir. Analizden sonra, ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize edilir ya da uygun bir kimyasal madde ile dezenfekte edilir. Daha sonra bu malzeme yıkanır ya da atılır.

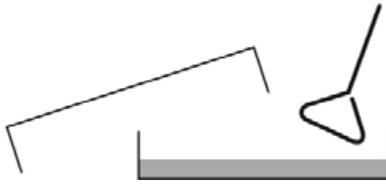
Şekil 11. Yayma Yöntemi Uygulanışı



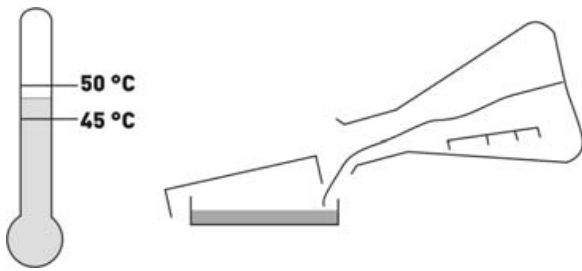
Steril Petri kutularına önce steril besiyeri en az 2 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülür (standart Petri kutuları için 12–15 mL). Besiyeri dökme sıcaklığı 45–50 °C olmalıdır. Ekim öncesi yüzey, yeterli bir şekilde kurutulmalıdır. Yüzey aşırı nemli ya da çok kuru olmamalıdır.



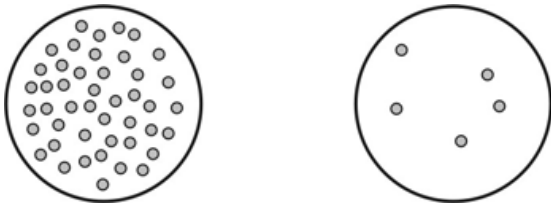
Bunun üzerine 0,1 (0,33; 1,0) mL örnek (sıvı gıda, homojenizatu veya uygun seyreltisi) -kontaminasyon olmamasına özen gösterilerek- aktarılır. Önceden dökülüp, depolanmış olan besiyerleri kullanılabilir. Petri kutusunun tabanına daha önceden gerekli tüm bilgilerin yazılmış olması gerekir.



Örnek aktarımından hemen sonra alkolde en az 2 dakika bekletilerek sterilize edilmiş Drigalski spatülü ile besiyeri yüzeyine homojen bir şekilde yayılır. Drigalski spatülü, bunzen beki alevinden hafifçe geçirilerek alkolü uzaklaştırılmış olmalıdır. Disposal spatül kullanılabilir.



Gerekirse, 45–50 °C'da tutulan 2. kat besiyerinden 5 mL kadar dökülür ve düzgün bir zeminde kendi halinde jelleşmeye bırakılır. 2. kat döküm standart uygulamada yoktur, koliform grup analizi gibi bazı özel analizlerde yapılan bir uygulamadır.



İnkübasyondan sonra Petri kutuları sayım, var/yok analizlerine uygun bir şekilde değerlendirilir. Analizden sonra, ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize ya da uygun bir kimyasal madde ile dezenfekte edilir. Daha sonra bu malzeme yıkanır ya da atılır.

Koliform bakterilerin VRB Agar besiyerindeki analizinde olduğu gibi hafif bir anaerob ortam sağlamak, PCA besiyerinde kolonilerin yayılmasını önlemek vb. nedenlerle bazı standartlarda ekimden sonra besiyeri üzerine ikinci kat besiyeri dökülür. Bu uygulama gerek yayma gerek dökme yöntemlerinde görülmektedir. Yayma yönteminde, çözelti besiyerine aktarıldıktan yaklaşık 10 dakika sonra (besiyeri çözeltiyi yeteri kadar emdikten sonra), dökme yönteminde ise agarlı besiyeri tam olarak katılaştıktan sonra, su banyosunda 45–50 °C'da tutulan besiyerinden 4–5 mL kadar ikinci kat olarak dökülür. İlave edilen bu kısım da tam olarak katılaştıktan sonra Petri kutuları inkübatöre kaldırılır.

Genel uygulamada ikinci kat olarak aynı besiyeri dökülmekle beraber, bazı özel standartlarda farklı besiyeri dökülmesi de görülmektedir. Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken bir diğerkonu, ikinci kat besiyerinin 4-5 mL olarak dökülmesi ve bunun tüm Petri kutusu yüzeyini kaplamasıdır. Bu işlem, el alışkanlığı ile kolaylıkla sağlanabilir.

Standart analizde yayma ve dökme yöntemi için yaklaşık 12,5 mL besiyeri kullanılması yeterlidir. Bazı standartlarda, ikinci kat besiyeri dökülecek ise bu değerler 10 mL + 4–5 mL olarak verilmektedir.

07.01.02. Dökme Yöntemi

Analiz edilecek gıda maddesi, gerekirse seyreltilerek ve/veya homojenize edilerek steril Petri kutusuna 1 mL olarak aktarılır; üzerine sterilize edilmiş ve 45–47 °C'da tutulan agarlı besiyerinden 12,5–15 mL kadar dökülür. Petri kutusunun masa üzerinde iken 888 çizilmesiyle örnek ile besiyeri karıştırılır. Besiyerinin katılaşmasından sonra Petri kutuları inkübatöre kaldırılır. Besiyeri ile örneğin karıştırılması el alışkanlığı gerektiren bir uygulamadır. Laboratuvara yeni gelmiş personel, ancak bu konuda yeterli deneyim kazandıktan sonra dökme yöntemi ile çalışmalıdır.

07.01.03. Yayma Yöntemi

Bu yöntemde sterilize edilmiş besiyeri, steril Petri kutusuna yaklaşık 12,5 mL hesabı ile dökülür. Bir diğerkonu, 100 mL besiyeri 8 Petri kutusuna eşit olarak dağıtılır. Besiyerinin katılaşması beklenir, yüzey kuruması sağlandıktan sonra 0,1 mL sıvı gıda örneği ya da homojenizatından 0,1 mL aktarılır. %76'lık (v/v) alkolde tutularak sterilize edilmiş olan cam ya da çelik Drigalski spatülü alevden geçirilerek alkol uzaklaştırılır. Tek kullanımlık steril plastik spatüller de vardır. Spatül kullanılarak besiyerine aktarılmış sıvı, tüm yüzeye homojen bir dağılım gösterecek şekilde yayılır.

Yayma yöntemi kullanıldığında dikkat edilecek en önemli nokta, spatülün sterilizasyonudur. Zamanla alkolün buharlaşmasına bağlı olarak konsantrasyon azalması olur ve kimyasal sterilizasyon sağlanamaz. Alkolde önceki ekimlerden kontamine olmuş ve canlılıklarını sürdüren mikroorganizmalar da ekimi yapılan besiyerine geçerek koloni oluşturur. Bu olasılık, özellikle toplam bakteri sayımında önemlidir. Alkoldeki spatülün alevden geçirilmesi sadece alkolün uzaklaştırılması içindir ve alkol yanarak uzaklaşırken ortaya çıkan ısı, spatül üzerindeki mikroorganizmaları tahrip etmeyebilir.

Spatülün sterilizasyonunda dikkat edilecek ikinci husus, alkolde kalma süresidir. Seri bir ekim sırasında spatülün alkolde 2 dakikadan daha az kalması yeterli bir sterilizasyon sağlamayabilir. Bu nedenle ekim yoğunluğuna göre çok sayıda spatül kullanılması, bunların sıra ile alkolden çıkarılarak kullanılması gerekmektedir. Son olarak, bunzen beki yanında duran alkolün alev alması ve yaralanmaya neden olma tehlikesinin hayli yüksek olduğu göz önünde tutulmalıdır.

Tüm bu sorunlar, bir kez kullanılıp atılan (disposal) spatül kullanılması ile giderilebilir. Her ne kadar laboratuvar analizlerinde disposal spatül kullanılması bir masraf unsuru olarak düşünülse de, cam spatüllerin kırılabilir olması, alkol giderleri, kontaminasyon tehlikesi gibi faktörler dikkate alındığında kayda değer ölçüde avantajlı olduğu görülür.

07.01.04. Koloni Sayısının Hesaplanması

İnkübasyon sonunda Petri kutularında sayım hızla yapılmalıdır. Herhangi bir nedenle inkübasyon sonrasında sayım yapılamayacak ise, Petri kutuları +4 °C'da en fazla 24 saat depolanabilir. Daha uzun süre ile depolanmış Petri kutularında sayım yapılma zorunluluğu varsa, elde edilecek sonuçlar güvenilir değildir ve analiz raporlarında bu durum açıkça belirtilmelidir.

Daha önce 30–300 arasında koloni içeren seyreltilerdeki ekimler dikkate alınır iken, artık ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının ağırlıklı aritmetik ortalaması alınarak örnekteki sayı hesaplanır. Bu hesaplamada kullanılan formül;

$N = C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$ şeklindedir. Burada;

N = Gıda örneğinin 1 gram ya da 1 mL'sinde mikroorganizma sayısı

C = Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V = Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim (mL)

n_1 = İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

n_2 = İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

d = Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır.

Bu formülde, 15–300 arasındaki koloni sayımları dikkate alınmaktadır. Farklı kaynaklarda 15–250, 25–250 vb. gibi farklı sınırlara da rastlanmaktadır. Ayrıca sayımı yapılacak mikroorganizmaya göre bu değer değişebilmektedir.

Örneğin FDA, süt ve ürünleri için PCA sayımlarında 25–250, VRB Agar sayımlarında 1–154 sınırlarını esas almaktadır. Maya–küf sayımlarında ise 15–150 olan Petri kutuları dikkate alınır.

Aşağıda bir sayım sonucunun değerlendirme örneği vardır.

Örnek: Yayma kültürel sayım yöntemi uygulanmış ve her seyreltiden 2 Petri kutusuna ekim yapılmış ve 10^{-2} seyreltide 219 ve 185, 10^{-3} seyreltide 28 ve 21 adet koloni elde edilmiştir. Formüle göre;

$$C = 219 + 185 + 28 + 21 = 453$$

$$V = 0,1 \text{ (yayma kültürel sayım için Petri kutularına 0,1'er mL pipetlenmiştir)}$$

$$n_1 = 2 \text{ (} 10^{-2} \text{ seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)}$$

$$n_2 = 2 \text{ (} 10^{-3} \text{ seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)}$$

$$d = 10^{-2} = 0,01 \text{ (ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır)}$$

$$N = C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$$

$$N = 453 / [0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}]$$

$$N = 453 / [0,1 (2,2 \times 0,01)]$$

$$N = 205.909,09$$

Bu değer, virgülden sonra 1 desimal ile gösterilmeli ve sonuç $2,1 \times 10^5$ kob/g (sıvı ise kob/mL) olarak verilmelidir.

Yukarıdaki örnekte 15–250 koloni/Petri kutusu sınırında değerlendirilmiştir. Eğer 25–250 koloni sınırında değerlendirilirse, sonuç aşağıdaki gibi olacaktır:

$$C = 219 + 185 + 28 = 432$$

$$V = 0,1 \text{ (yayma kültürel sayım için Petri kutularına 0,1'er mL pipetlenmiştir)}$$

$$n_1 = 2 \text{ (} 10^{-2} \text{ seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)}$$

$$n_2 = 1 \text{ (} 10^{-3} \text{ seyreltiden ekim yapılan 1 Petri değerlendirmeye alınmıştır)}$$

$$d = 10^{-2} = 0,01 \text{ (ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır)}$$

$$N = C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$$

$$N = 432 / [0,1 \times (2 + 0,1 \times 1) \times 10^{-2}]$$

$$N = 432 / [0,1 (2,1 \times 0,01)]$$

$$N = 205.714,29; 2,1 \times 10^5$$

Görüldüğü gibi daha seyreltik olan ekimlerdeki Petri kutularının değerlendirilmeye alınması ya da alınmaması sayım sonucunu pek etkilememektedir. Benzer şekilde sırası ile 240, 260; 34, 41 koloni elde edilen sayım sonucu 25–250 sınırında değerlendirildiğinde $2,6 \times 10^5$ sonucu alınacak, 30–300 sınırında yine $2,6 \times 10^5$ değeri elde edilecektir.

Desimalin yuvarlatılması konusunda da farklı yaklaşımlar olabilmektedir. Standart olarak 205 sayısı 210 olarak yuvarlatılmakla beraber, yuvarlatılacak sayı 5 ise, bunun önündeki sayının tek ya da çift olmasına göre yuvarlatma, sırası ile yukarı ya da aşağı doğru yapılabilir. Bu örnekte 205 sayısındaki "0" çift sayıldığı için yuvarlatma aşağı doğru yapıp, 200 olarak verilmektedir. Kuşkusuz, bu yöntemle göre 195 sayısı da yuvarlatıldığı zaman 200 değeri elde edilmektedir. Bu uygulama, FDA tarafından benimsenmektedir.

Her ne kadar mikrobiyolojik analiz sonucu olarak yukarıdaki örneklerde hesaplanan değer kullanılsa da, gerçek sayının bu olduğu beklenmemelidir. Petri kutusundaki koloni sayısı azaldıkça istatistik açıdan hata olasılığı artmakta, tersine olarak Petri kutularındaki koloni sayısı arttıkça bu tip hata olasılığı azalmaktadır. Ancak, bu kez sayım yapılırken hata oluşması ve bazı kolonilerin sayılmaması nedeni ile, üst sınır olarak mikroorganizmaya göre değişen değerler alınmaktadır.

Sayım sonucu ile bulunan değerlerin %95 güvenlik sınırları ile alabileceği değerlerin hesaplanmasında kullanılan formül;

$$\delta = \{[(C / B) + (1,92 / B)] \pm [(1,96 \times \sqrt{C / B})]\} / d \text{ şeklindedir.}$$

Bu formülde B olarak gösterilen değer $B = V(n_1 + 0,1 \times n_2)$ ile hesaplanır. 1,92 ve 1,96 değerleri istatistik sabitlerdir. Diğer birimler yukarıdaki formülde açıklanmıştır.

Yine yukarıda örnekteki $2,1 \times 10^5$ kob/g değeri (yayma kültürel sayım; 10^{-2} seyreltide 219 ve 185, 10^{-3} seyreltide 28 ve 21 koloni) bu formüle göre;

$$B = 0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) = 0,22 \text{ ve}$$

$$C = 219 + 185 + 28 + 21 = 453 \text{ olmak üzere;}$$

$$\delta = \{[(453/0,22) + (1,92/0,22)] \pm [(1,96 \times \sqrt{453 / 0,22})]\} / 0,01$$

$$\delta = \{[2059,09 + 8,73] \pm [1,96 \times (21,28 / 0,22)]\} / 0,01$$

$$\delta = \{[2059,09 + 8,73] \pm [1,96 \times 96,73]\} / 0,01$$

$$\delta = \{[2067,82] \pm [189,59]\} / 0,01$$

$$\delta_1 = 2257,41 / 0,01 = 225.741 = 2,3 \times 10^5$$

$$\delta_2 = 1878,25 / 0,01 = 187.823 = 1,9 \times 10^5$$

olarak hesaplanır.

Bir diğer deyiş ile ilk formül ile elde edilen $2,1 \times 10^5$ değeri %95 güvenlik sınırları içinde $2,3 \times 10^5$ ile $1,9 \times 10^5$ arasındaki bir değerdir ve yuvarlatma yapılmadan alınan $N = 205.909$; $\delta_1 = 225.741$; $\delta_2 = 187.823$ değerleri kullanıldığında hata olasılığı;

$$[(225.741 / 205.909) - 1] \times 100 = +\%9,63 \text{ ve}$$

$$[(187.823 / 205.909) - 1] \times 100 = -\%8,78 \text{ olarak bulunur.}$$

15'ten az kolonilerin sayılmama kuralı dikkate alınmadan ve yukarıdaki örneğe yakın olarak; dökme kültürel sayımda 10^{-3} seyreltiden 19 ve 16, 10^{-4} seyreltiden 3 ve 2 koloni elde edildi ise sonuç 18.182 olarak alınacak, $\delta_1 = 24.689$ ve $\delta_2 = 13.420$ olarak hesaplanacak, hata sınırı ise "+ %35,8" ile "- %26,2" olarak bulunacaktır.

Sayımda 250, 300 gibi belirlenen üst sınırın üzerinde koloni varsa ve sayım yapılması zorunlu ise tercihen koloni sayacı ve mutlaka büyüteç kullanılarak 1 cm^2 alan içinde kaç koloni olduğuna bakılır.

Ortalama olarak 1 cm^2 alanda 5–10 arasında koloni varsa koloni sayacı kullanılarak yatay ve düşey olarak 1 cm^2 olan 6'şar hatta sayım yapıp, ortalaması alınır ve Petri kutusu alanı ile orantı kurularak sayım sonucu hesaplanır. 1 cm^2 alanda 10'dan fazla koloni varsa herhangi 4 alanda sayım yapıp, ortalama alınır ve yine Petri kutusu alanı ile oranlanarak sonuç bulunur. Her iki koşulda da sonuç "tahmin" olarak verilir.

Koloni sayısının hesaplanmasında sıklıkla karşılaşılan bir soru, aynı seyreltiden 2 paralel ekim yapıldığında sayım sonuçları arasındaki farktır. Genel olarak; %0–10 farklılık "çok iyi", %10–15 farklılık "iyi" ve %15–20 farklılık "kabul edilebilir" olarak değerlendirilmektedir. Daha yüksek koloni sayısı farklılıkları görülüyor ise bunun nedenleri sistematik olarak araştırılmalı ve farkın aşağıya çekilmesi için düzeltici uygulama yapılmalıdır.

Burada dikkati çeken bir ayrıntı vardır. 2 paralel ekimde 80 ve 100 koloni sayımı elde edildi ise, tolerans hesabında hangi sayının dikkate alınacağı tartışılmalıdır. 80 koloni dikkate alınırsa, bunun %20 fazlası 96 olup, kabul edilebilir sınırın dışındadır. Oysa 100 koloni esas alınırsa, bunun %20 eksiği 80 olup, bu kez kabul edilebilir sınır içindedir. Analiz yapan kişinin lehine olarak büyük değer esas alınabileceği gibi, analiz sonucunun daha duyarlı olması açısından küçük değer de dikkate alınabilir. Bu konu, ilgili talimatta belirtilmelidir.

Sayımda dikkat edilmesi gereken bir diğer özellik, performans testidir ve ayda en az bir kez yapılması önerilir. Buna göre sayım yapan personelin aynı Petri kutusunda bir kez daha sayım yapması sağlanır. 2 sonuç arasında kabul edilebilecek en yüksek fark %8'dir. Aynı Petri kutusunda 2 ayrı personelin sayım sonuçları arasında ise, en çok %10 fark kabul edilebilir. Bu şekilde personelde performans düşüklüğü fark edilirse, düzeltici önlem alınmalıdır.

07.01.05. İdentifikasyon Esaslı Sayım ve Doğrulama

Bir örnekte sayım için yarı selektif bir besiyeri kullanıldı ise hedef mikroorganizma sayısı belirli bir identifikasyon işleminden sonra yapılabilir.

Örneğin, koliformların sayımı için yaygın olarak kullanılan VRB Agar besiyerinde gelişen tipik koloniler koliform grup olarak sayıldıktan sonra bunların içinde kaç adet *E. coli* olduğu da belirlenebilir.

Bu amaçla koliform grup bakteri kolonileri içinden koloni sayısına göre 5–20 arasında olmak üzere rasgele seçim yapıp, bunlar izole edilir ve her biri ayrı ayrı tanımlanır. Sonra bunların içindeki *E. coli* sayısı, toplam koliform grup bakteri sayısına oranlanır ve seyreltme faktörü de hesaba katılarak analiz edilen örnekteki *E. coli* sayısı hesaplanır.

Örnek: Petri kutusunda toplam 110 koloni içinde 60 adet tipik koliform bakteri kolonisi vardır. Bunlardan 15 adedi izole edilmiş, yapılan identifikasyon sonunda 15 koloni içinde 9 adedinin *E. coli* olduğu belirlenmiştir. Buna göre 15 koloninin 9 adedi *E. coli* ise, 60 koloninin 36 adedi *E. coli* 'dir. Burada dikkat edilmesi gereken ayrıntı; *E. coli* sayısının tüm koloniler içinden değil, tipik koloniler içinden belirlenmiş olduğudur. Plate Count Agar gibi bir besiyerinde 70 koloni sayıldı, bunlardan rasgele seçilen 10 adedinden 4 adedi *E. coli* olarak doğrulandı ise, bu kez Petri kutusunda 28 *E. coli* olduğu anlaşılır.

Benzer şekilde, bazı sayımlarda tipik de olsa kolonilerin doğrulanması istenebilir. Örneğin, toplam Enterobacteriaceae sayımında standart olarak VRBD Agar besiyeri kullanılır. Bu besiyerinde gelişen siyaha yakın koyu kırmızı renkli koloniler toplam Enterobacteriaceae olarak sayılır. Bazı standartlarda bu kolonilerden en az 5 adedinin oksidaz testi ve Glikoz Agar besiyerinde glikoz testi ile doğrulanması da istenebilmektedir.

07.01.06. Sonuçların Verilmesi

Katı besiyerinde yapılan sayım sonuçlarının verilmesinde koloni oluşturan birim esas alınır. Koloni sayısı hesaplandıktan sonra sonuç, katı gıdalarda (örneğin $7,3 \times 10^2$) kob/g, sıvı gıdalarda (örneğin $3,2 \times 10^1$) kob/mL olarak verilir. Bu değerler, yukarıdaki örneklerde olduğu gibi ya da sırasıyla 730 kob/g ve 32 kob/mL olarak da verilebilir.

Ekim yapılan en derişik seyreltide bile koloni gelişmesi görülmezse sayının 0 olarak verilmesi hatalı olur. Bu gibi sonuçlar ancak 1 mL ya da 1 gram numunenin doğrudan var/yok testi sonucunda ve aşağıdaki örnekte olduğu gibi, sıvı gıdadan 1 mL ekim yapılması halinde verilebilir.

Petri kutularında koloni gelişmesi olmazsa, aşağıdaki formüle göre hesaplanan değer analiz sonucu olarak verilir:

Sayı: $< \{1 / [(seyreltme\ faktörü) \times (Petri\ kutusuna\ pipetlenen\ hacim)]\}$

Örnek: Katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden yayma yöntemi ile analiz yapılmış ve koloni gelişmesi olmamıştır. Formüle göre sayı:
 $< \{ 1 / [(10^{-1}) \times (0,1)] \} = 1 / 0,1 \times 0,1 = 100$; sonuç "100 kob/gramdan daha az" olarak verilir.

Örnek: Katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden yayma yöntemi ile 3 Petri kutusuna toplam 1 mL dağıtılmış ve koloni gelişmesi olmamıştır. Formüle göre sayı:
 $< \{ 1 / [(10^{-1}) \times (1)] \} = 1 / 0,1 \times 1 = 10$; sonuç "10 kob/gramdan daha az" olarak verilir.

Örnek: Sıvı gıdanın kendisinden (10^0 seyrelti) yayma yöntemi 3 Petri kutusuna toplam 1 mL dağıtılmış ve koloni gelişmesi olmamıştır. Formüle göre sayı:
 $< \{ 1 / [(10^0) \times (1)] \} = 1 / 1 \times 1 = 1$; sonuç "1 kob/mL'den daha az" olarak verilir. Bu örnekte fiilen 1 mL numune analize alındığı için sonuç "1 mL'de yok" şeklinde verilebilir.

Sayım sonuçlarının verilmesinde farklı kurallar da uygulanabilmektedir. Örneğin FDA, süt ve ürünleri analizinde PCA besiyerinde toplam bakteri sayımı için 0–24 arasında koloni bulunan Petri kutularını "<25 x seyreltme faktörü" olarak verilmesini isterken, koliform analizinde Petri kutularında 1–154 arası koloni olmasını kabul ettiği için Petri kutusunda 6 ya da 153 gibi bir koloni sayısını doğrudan kullanmakta, tersine olarak 154'ten fazla olan sayıları ise ">150 x seyreltme faktörü" olarak değerlendirmektedir.

07.02. En Muhtemel Sayı Yöntemi

07.02.01 Genel Bilgiler

Sıvı besiyeri kullanılan sayım yöntemi denildiğinde, "En Muhtemel Sayı; EMS (Most Probable Number; MPN)" yöntemi anlaşılır. Bu yöntem, eski kaynaklarda "Kuvvetle Muhtemel Sayı; KMS" olarak da anılır. Yöntemin esası, ardışık 3 seyreltiden 3'er adet sıvı besiyerine 1'er mL ekim, inkübasyon sonunda tüplerin pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmesi ile elde edilecek kodun, istatistik yöntemlerle elde edilmiş çizelgeden okunmasıdır.

Yöntemin "En Muhtemel Sayı" olarak adlandırılma nedeni; yukarıda da belirtildiği gibi, örnekteki mikroorganizma sayısının istatistiksel olasılık hesapları ile elde edilmiş çizelgelerden yararlanılarak hesaplanmasıdır. Ekimi yapılan tüpe en az 1 adet canlı hücre geçer ise bu tüp inkübasyon sonunda pozitif sonuç, aksine olarak tüpe 1 adet bile canlı hücre geçmez ise inkübasyon sonunda bu tüp negatif sonuç verir. Bu yöntemin uygulanışı basit olarak ardışık 3 seyreltiden 3'er adet 10 mL besiyerine 1'er mL ekim yapılması olarak tanımlanabilir.

EMS yöntemi, tüp seyreltme yöntemi ile yarı kantitatif sayımın modifiye edilmiş şeklidir. Tüp seyreltme yöntemi "titre belirlemek" için halen günlük uygulamada kullanılmakta olup, 07.04. Bölümde verilmiştir. Basit olarak, standart şekilde seyreltmeler yapılır, her seyreltmeden uygun bir sıvı besiyerine 1'er mL aktarılır. Seyreltmede, giderek azalan sayı nedeniyle ardışık seyreltilerden artık birisinden ve bundan daha seyreltik olan seyreltilerden besiyeri tüplerine 1 adet dahi canlı hücre geçmeyecektir. İnkübasyon sonunda tüpler (+) ya da (-) olarak değerlendirilir.

İçinde 1.000/mL canlı hücre olan bir çözeltiliden yapılan standart seyreltmeler ve ardından sıvı besiyeri olan tüplere 1'er mL ekim ve inkübasyon sonunda, tüpler aşağıdaki gibi değerlendirilir.

Şekil 12. Tüp Seyreltme Yöntemi

10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1.000/mL	100/mL	10/mL	1/mL	0,1/mL	0,01/mL
↓	↓	↓	↓	↓	↓
U	U	U	U	U	U
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

Bu örnekte 10^{-3} seyreltiden alınan 1 mL ile besiyerine 1 canlı hücre geçtiği için bu tüp pozitif sonuç vermiştir. Oysa 10^{-4} seyreltinin 1 mL'sinde 0,1 canlı hücre vardır. Bunun anlamı; 1 mL'de 1 canlı hücre olma olasılığı %10'dur ve dolayısıyla %90 olasılıkla bu tüpten yapılan ekim (-) sonuç verecektir. 10^{-5} seyreltiden yapılan ekimde ise %99 olasılıkla (-) ve ancak %1 olasılıkla (+) sonuç alınır.

Yarı kantitatif değerlendirme kuralları çerçevesinde böyle bir sonuç alınırsa sonuç "örnekte 10^3 /mL ile 10^4 /mL arasında mikroorganizma var" şeklinde verilir ve bu örnek için bu sonuç doğrudur.

Aslında, örneğin 1 mL'sinde 800 canlı hücre olduğu varsayılır ise 10^{-1} seyreltide mL'de 80; 10^{-2} seyreltide mL'de 8 ve 10^{-3} seyreltide mL'de 0,8 adet bakteri olacaktır. mL'de 0,8 adet bakteri olmasının anlamı 1 mL'de 1 adet bakteri bulunma olasılığının %80 olmasıdır. Buna göre bu tüpten yapılan ekim %80 olasılıkla (+) ve %20 olasılıkla (-) sonuç verecektir. Benzer şekilde 10^{-4} seyreltiden yapılan ekimde %8 olasılıkla (+) ve %92 olasılıkla (-) sonuç alınır. Daha sıklıkla beklenildiği gibi 10^{-3} seyrelti pozitif ve 10^{-4} seyrelti negatif sonuç verirse, analiz edilen örnekte 1.000 ile 10.000/mL arasında bakteri olduğuna karar verilir, oysa sadece 800 adet/mL bakteri vardır. Bu nedenle sonuçlar, yarı kantitatif yaklaşımla verilmez.

Aynı örnekte her seyreltiden 10'ar besiyerine ekim yapılırsa; basit olasılık hesaplarına göre 10^{-3} seyreltiden yapılan ekimde 8 (+) ve 2 (-) sonuç alınacaktır. 10^{-4} seyreltiden ise muhtemelen 1 (+) ve 9 (-) sonuç elde edilir.

EMS yönteminin esası da budur. Her seyreltiden birden fazla tüpe ekim yapılır ve inkübasyon sonunda tüpler ayrı ayrı değerlendirilip, elde edilen kod aracılığı ile örnekteki sayı "tahmin edilerek" verilir.

Her seyreltiden 3, 5 ya da 10'ar tüpe ekim yapılarak elde edilecek (+) ve (–) sonuçlara göre geliştirilmiş istatistik esaslı çizelgeler bulunmakla birlikte, en yaygın olarak kullanılan 3'er tüpe ekimdir ve bu kitapta verilen de bu uygulama şeklindedir. Kuşkusuz, her seyreltiden 5'er tüpe ekim yapılıyorsa, değerlendirmede bu ekim şekline özgü çizelge kullanılmalıdır.

Yukarıda verilen örnek bu kez EMS ekim yöntemine göre aşağıda yinelenmiştir.

Şekil 13. EMS Yönteminde Kod Kavramı

0^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
800/mL	80/mL	8/mL	0,8/mL	0,08/mL	0,008/mL
↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓
U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U
+	+	+	+	–	–
3'te 3 (+)	3'te 3 (+)	3'te 3 (+)	3'te 2 (+)	3'te 0 (+)	3'te 0 (+)
3	3	3	2	0	0

Her seyreltiden 3'er tüpe ekim yapıldığına göre bu 3 tüpün kaç adedinde (+) sonuç alındığı sayılır ve bu şekilde kod elde edilir. Kod, ardışık 3 seyreltinin (+) değerleridir. Diğer bir deyiş ile eğer 10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2} serisi alınırsa kod 3 3 3 ve eğer 10^{-3} ; 10^{-4} ve 10^{-5} serisi alınırsa bu kez kod 2 0 0 olmaktadır.

Yöntemde ardışık 3 seyreltiden elde edilen kod kullanılacağına göre, hangi ardışık 3 seyreltiden ekim yapılacağı kararlaştırılmalıdır. Örnekteki mikroorganizma yükü hakkında bir bilgi yoksa ya da daha güvenli bir sonuç elde etmek istenirse, ardışık 4 seyreltiden ekim yapılır, sonuçlar alındıktan sonra hangi ardışık 3 seyreltinin EMS çizelgesinde kullanılacağı belirli bir kural çerçevesinde seçilir. Bu konu 07.02.02. EMS yönteminin uygulanması bölümünde açıklanmıştır.

EMS yönteminde sıvı besiyeri olan tüplerin mutlaka 10 mL olması kural değil, genel bir benimseyiştir. *Staph. aureus* 'un EMS yöntemi ile sayımında kullanılan Giolitti–Cantoni Broth 19 mL olarak hazırlanır (bakınız 18.03. Bölüm). Tersine, standart analizde pek çok laboratuvarında besiyerleri 9 mL olarak hazırlanmaktadır. 9 mL kabul edilebilir bir değerdir, ancak daha az miktarda besiyeri kullanılması halinde sahte negatif sonuçlar alınabilir.

En yaygın kullanılan EMS çizelgesi aşağıda verilmiştir (Çizelge 06). Bundan başka EMS çizelgeleri olduğu da unutulmamalıdır.

Çizelge 06. EMS Çizelgesi; EMS/g (mL). Partiden 1 örnek alınması içindir.

P o z i t i f t ü p l e r			Sayı ve kategori		%95 güvenlik sınırı		%99 güvenlik sınırı	
1 mL	0,1 mL	0,01 mL	EMS	Kategori	Alt	Üst	Alt	Üst
0	0	0	< 0,30	-	0,00	0,94	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,10	3	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	0	1,10	2	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	1	1,50	3	0,50	3,80	0,20	5,20
1	3	0	1,60	3	0,50	3,80	0,20	5,20
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,40	2	0,40	3,50	0,20	4,60
2	1	0	1,50	1	0,40	3,80	0,20	5,20
2	1	1	2,00	2	0,50	3,80	0,20	5,20
2	2	0	2,10	1	0,50	4,00	0,20	5,60
2	2	1	2,80	3	0,90	9,40	0,50	14,20
2	3	0	2,90	3	0,90	9,40	0,50	14,20
3	0	0	2,30	1	0,50	9,40	0,30	14,20
3	0	1	3,80	2	0,90	10,40	0,50	15,70
3	0	2	6,40	3	1,60	18,10	1,00	25,00
3	1	0	4,30	1	0,90	18,10	0,50	25,00
3	1	1	7,50	1	1,70	19,90	1,10	27,00
3	1	2	12,00	3	3,00	36,00	2,00	44,00
3	2	0	9,30	1	1,80	36,00	1,20	43,00
3	2	1	15,00	1	3,00	38,00	2,00	52,00
3	2	2	21,00	2	3,00	40,00	2,00	56,00
3	2	3	29,00	3	9,00	99,00	5,00	152,00
3	3	0	24,00	1	4,00	99,00	3,00	152,00
3	3	1	46,00	1	9,00	198,00	5,00	283,00
3	3	2	110,00	1	20,00	400,00	10,00	570,00
3	3	3	>110,00					

Çizelge 06'da normal olarak $4^3 = 64$ adet olasılık verilmesi gerekirken, bazı sayım sonuçları verilmemiştir. Normal olarak en az konsantrite olan seyreltiden (örneğin 10^{-3}) 3 tüpten 3 pozitif sonuç elde edildi ise, bundan 10 kez daha fazla örnek ve dolayısı ile 10 kez daha fazla sayıda mikroorganizma içeren 10^{-2} seyreltiden yapılan 3 tüpün 3'ünde de pozitif sonuç alınması beklenir. Benzer şekilde 10^{-1} seyreltiden 3 tüpe yapılan ekimde de 3 pozitif sonuç alınmalıdır.

Dolayısıyla, 0–0–3 ya da 1–0–3 gibi bir sonuç alınır ise böyle bir durumun istatistik olarak çok küçük bir olasılıkla gerçekleşebileceği ve deney sırasında çok büyük bir olasılıkla hata yapılmış olduğu açıktır.

Örneğin, 2-0-2 ve 3-1-2 gibi sonuçların laboratuvar analizleri sırasında hata yapılmadan elde edilme olasılığı %0,1 kadardır. Böyle bir sonuç doğru olarak elde edilse bile aynı örnekten aynı sonucun tekrar elde edilmesi, diğer bir deyiş ile bu sonucun "yeniden elde edilebilirliği (tekrarlanabilirliği)" çok düşük bir olasılıktır. 0-0-2 ve 1-1-3 gibi sonuçların hatasız elde edilme olasılığı ise hemen hemen hiç yoktur. Bu nedenle, bu gibi sonuçları gösteren kodlar standart çizelgelerde verilmemektedir. Bununla birlikte, aynı partiden yapılan 10 ekim sonucunda da 2-2-2 gibi bir sonuç alınır, ancak bu koşulda kategorinin 3 olarak kabul edilebileceği şeklinde EMS çizelgeleri de bulunmaktadır. Burada partiden sadece 1 örnek alınması halindeki sonuçların yer aldığı çizelge verilmiştir.

Çizelgedeki kategoriler aşağıdaki şekilde açıklanabilir.

-Kategori 1: Üründeki mikroorganizma sayısı hesaplanan sayıya eşit olduğunda, bu kombinasyon ile elde edilen sonuç, elde edilebilecek kombinasyonlar içinde en yüksek olasılığa sahip olanlardan birisidir. Bu kategoride en az olasılıkla (güvenlik sınırı değerleri) elde edilebilecek bir sayım sonucundan daha düşük bir olasılıkla sonuç elde etme olasılığı en fazla %5'tir. Bu kategori ile elde edilen kodlar güvenli olup, laboratuvar tarafından doğrudan değerlendirilir.

-Kategori 2: Üründeki mikroorganizma sayısı hesaplanan sayıya eşit olduğunda, bu kombinasyon ile elde edilen sonuç, elde edilebilecek kombinasyonlar içinde kategori 1'den daha az bir olasılıkla elde edilebilir. Ancak, bu kategoride en az olasılıkla (güvenlik sınırı değerleri) elde edilebilecek bir sayım sonucundan daha düşük bir olasılıkla sonuç elde etme olasılığı en fazla %1'dir. Bu kategoride elde edilen kodlar daha az güvenilirdir. Tercihen, bu şekilde elde edilen kodlar üst yetkiliye danışılarak değerlendirilmelidir.

-Kategori 3: Üründeki mikroorganizma sayısı hesaplanan sayıya eşit olduğunda, bu kombinasyon ile elde edilen sonuç, elde edilebilecek kombinasyonlar içinde kategori 2'den daha az bir olasılıkla elde edilebilir. Ancak, bu kategoride en az olasılıkla (güvenlik sınırı değerleri) elde edilebilecek bir sayım sonucundan daha düşük bir olasılıkla sonuç elde etme olasılığı en fazla %0,1'dir. Bu kategorideki kodlar ise kayda değer ölçüde güvenilirmez olduğu için tercihen deney tekrarlanmalı ya da mutlaka üst yetkilinin onayı ile değerlendirilmelidir.

Çizelgede 1; 0,1; 0,01 olarak verilen ekimler sırasıyla 10^0 ; 10^{-1} ; 10^{-2} seyreltilerden 1'er mL ekim yapılması anlamındadır. Katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden 10 mL ekim, 10^0 seyreltiden 1 gram ekim anlamındadır.

Bu şekilde yapılan ekim sonucu, 2-1-0 değeri elde edildi ise gıdada 1,50 adet/g (mL) canlı ve aktif mikroorganizma olduğu, bu sayının %95 güvenlik sınırlarında 0,40 ile 3,80 arasında olabileceği, güvenlik sınırı olarak %99 seçilirse gıdadaki sayının 0,20 ile 5,20 arasında olabileceği anlaşılır.

Sıvı bir gıdada sırasıyla 10^{-1} – 10^{-2} , 0,1 mL ekim yapıldı ve 2–1–0 sonucu elde edildi ise, yukarıdaki örnekte verilen tüm değerler 10 mL için geçerlidir. Diğer bir deyişle gıdanın 1 mL'sinde $1,50 / 10 = 0,15$ adet mikroorganizma bulunmaktadır. Tersine olarak, sırasıyla 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltilerden yapılan ekimlerde yine 2–1–0 sonucu alındı ise 1 g (mL) örnekte $1,50 / 0,01 = 150$ adet mikroorganizma bulunmaktadır. Güvenlik sınırları da bu örneklere paralel olarak değişir. İkinci örnekte %95 sınırdaki değerler 40 ve 380 EMS olarak alınır. Buradaki 1,50 değeri, orijinale göre 10^2 kez seyreltilmiş olan 10^{-2} seyreltideki tüpün 1 mL'sindeki sayıdır.

Katı gıdada ise en düşük olarak 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} seyreltilerden 1'er mL ekim yapılabilir. Bununla beraber, gerekirse katı gıda standart 10 g + 90 mL şeklinde homojenize edilir, 10^{-1} seyreltiden 10 mL hacim alındığında, orijinal örnekten 1 gram alınmış gibi olur. Bu uygulamada, 10 mL homojenizat (ya da sıvı örneğin kendisi) eklenecek besiyerinin çift kuvvette hazırlanmış olması gerektiği de asla unutulmamalıdır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

Farklı literatürde, EMS konusunda yine her seyreltiden 3'er besiyerine ekim yapılması halinde farklı EMS değerlerine rastlanabilir. Yaygın olarak rastlanan bir diğer EMS çizelgesinde 1; 0,1; 0,01 mL ekim yerine 0,1; 0,01; 0,001 mL ekim yapılması koşulundaki sonuçlar verilir. Buna göre örneğin, 3 1 0 kodu karşılığında 4,30 değeri yerine 43,0 değeri verilir.

Yukarıdaki (şekil 13) örneğe göre 3 2 0 kodu elde edilmiştir ve çizelge 06'da bu değer için karşısında 9,30 EMS vardır. Ardışık 3 seyreltinin en derişiği 10^{-2} olduğuna göre bu seyreltinin mL'sinde en muhtemel (olası) olarak 9,30 canlı hücre olduğu anlaşılır. Bu ise, orijinal örnekte 930 hücre/mL anlamına gelir. 10^{-3} seyreltideki 3 tüpün 2 adedi değil de 1 adedi pozitif sonuç vermiş olsa idi bu kez 3 1 0 kodu karşılığı olarak 4,30 ve buradan 430 hücre/mL sonuç elde edilecekti.

Bu durumda, yukarıdaki örnekte 800 hücre/mL olan sayı için; çok muhtemel olarak ya 930 ya da 430 sonucu elde edilecektir. Uygulanan yöntemin "En Muhtemel Sayı" olarak adlandırılmasının nedeni de zaten budur.

07.02.02. EMS Yönteminin Uygulanışı

Yöntemin uygulanışı aşağıda özet olarak verilmiştir. Ayrıca şekil 14'te yöntemin uygulanışı şematik olarak gösterilmiştir.

-Günlük gıda kontrolünde ardışık 3 seyreltiden ekim yeterlidir. Bu amaçla katı gıdalarda 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltiler, sıvı gıdalarda ise beklenen sayıya göre ya 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} ya da 10^0 , 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltiler kullanılır. Daha fazla seyreltme gerekiyorsa, bunun yerine yayma ya da dökme yöntemi tercih edilmelidir.

-Durham tüpü olan besiyerlerinde ekim öncesi gaz kontrolü yapılmalı, gaz olan tüplere ekim yapılmamalıdır. Durham tüpü olan besiyerleri herhangi bir aşamada tüp karıştırıcı kullanılarak karıştırılmaz.

-Her seyreltiden 3 besiyeri tüpüne ekim yapılır. Tüplerde standart olarak 10 mL sıvı besiyeri bulunurken, amaca uygun olarak 19 mL olarak da hazırlanabilir. Standart ekimde seyreltilerden 1'er mL ekim yapılmakla beraber, özel uygulamalarda ilk seyreltiden 10'ar mL ekim yapılabilir. Bazı uygulamalarda her seyreltiden 5'er tüpe ekim yapılır. Bunların değerlendirme çizelgeleri farklıdır.

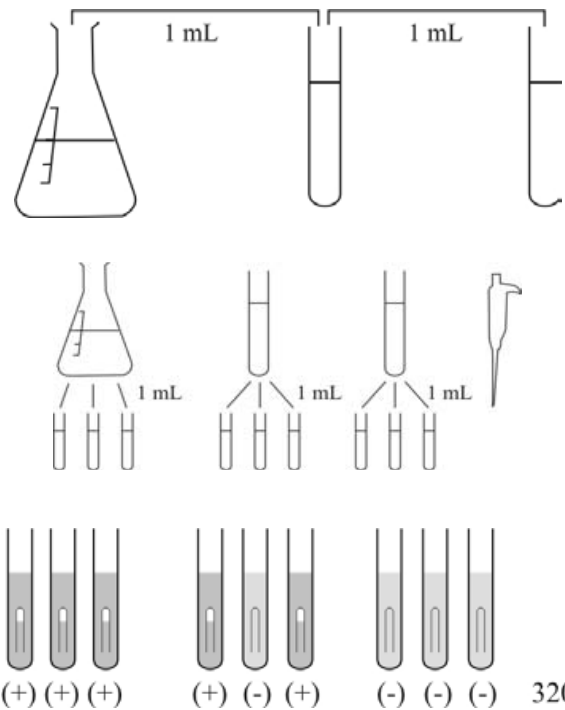
-10:90 mL şeklinde yapılan ilk seyreltme Tamponlanmış Peptonlu Su gibi bir besiyerinde yapılmış ve diğer tüplerde de besiyeri olarak yine Tamponlanmış Peptonlu Su kullanılıyor ise ilk seyreltiden steril 3 boş tüpe 10'ar mL aktarılabilir. Bu koşulda katı örnekten ilk üç tüpe doğrudan 1 gram aktarılmış gibi olur.

-Bazı çalışmalarda canlandırma işlemi uygulanır. Bu amaçla örneğin, toplam Enterobacteriaceae sayımında Tamponlanmış Peptonlu Su besiyerine ekim yapılır, buradan EE Broth besiyerine ekim yapılır ve en son olarak da bu besiyerindeki pozitif tüplerden VRBD Agar besiyerine sürme yapılır.

-Gerekirse tüplerin üzerine sıvı parafin, agar vb. maddeler ilave edilebilir.

-İnkübasyon sonunda tüpler değerlendirilir (bakınız; 07.02.03. Bölüm). Elde edilen kod ile standart EMS çizelgesinden yararlanılarak örnekteki sayı hesaplanır. Sayım sonunda kullanılan tüm malzeme sterilize edilerek yıkanır ya da atılır.

Şekil 14. EMS Yönteminin Uygulanışı



Gıda örneği 1:9 oranında homojenize edilip (10^{-1}), bundan standart yöntemle devam edilerek 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltiler elde edilir. Seyreltmede süt ürünleri için $\frac{1}{4}$ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

Her seyreltiden 3'er adet sıvı besiyerine ayrı ayrı 1'er mL aktarılır. Gıdada beklenen ya da hedef alınan sayıya göre ilk seyreltiden çift kuvvette hazırlanmış besiyerlerine 10'ar mL ekim yapılabilir.

İnkübasyondan sonra bütün tüpler (+) ya da (-) olarak değerlendirilir. Bu, basitçe bulanıklık ve/veya gaz oluşumu ile yapılabileceği gibi, muhtemel pozitif tüplerden sıvı ya da katı besiyerlerine ekim yapılabilir.

Daha güvenli sonuçlar elde etmek isteniyorsa 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olmak üzere ardışık 4 seyreltiden ekim yapıp, sonuçlara göre EMS çizelgesinde kullanılacak ardışık 3 seyrelti seçilir. Burada izlenmesi gereken kural aşağıda verilmiştir:

-Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1'den fazla 3 pozitif sonuç varsa, daha az konsantre olan seyrelti ile başlayan seri dikkate alınmalıdır. Örneğin gıdada 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olmak üzere ardışık 4 seyreltiden 3'er tüpe yapılan ekimlerde sırası ile 3-3-2-1 şeklinde sonuç alındı ise 3-2-1 serisi dikkate alınmalıdır.

-Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1 adet 3 pozitif sonuç varsa, 3 pozitif alınan seri ile başlanılmalıdır. Örneğin sırasıyla 3-2-1-0 şeklindeki bir seride değerlendirilecek olan 3-2-1'dir.

-Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 0 adet 3 pozitif sonuç varsa, sondaki seri dikkate alınmalıdır. Örneğin 2-1-1-0 serisinde 1-1-0 serisi kullanılmalıdır. Ancak birden çok 3 negatif sonuç varsa (örneğin 2-1-0-0) bu kez 2-1-0 serisi kullanılmalıdır.

07.02.03. Tüplerin Değerlendirme Kuralları

EMS yönteminde her tüpün pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmesi esastır. Buna göre tüplerin değerlendirilmesi, kullanılan besiyeri ve analiz yöntemine göre birbirinden çok farklı şekillerde yapılır. Bu amaçla ilgili talimatlar ayrıntılı olarak hazırlanmalı ve bunlara tam olarak uyulmalıdır. Aşağıda değerlendirme kuralları üzerinde bazı örnekler verilmiştir:

-Nutrient Broth'ta toplam bakteri analizinde tüpte bulanıklık pozitif sonuçtur.

-Koliform grubu bakteri analizinde Durham tüplerinde bulanıklık ve gaz oluşması pozitif sonuçtur (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-*E. coli* analizinde MUG'lu besiyerindeki Durham tüplerinde bulanıklık ve gaz oluşması ile uzun dalga boylu UV lambası ile floresan ışıma pozitif sonuçtur.

-*S. aureus* analizinde siyahlaşma olan tüplerden Baird-Parker Agar besiyerine ekim yapılır, tipik kolonilerin görüldüğü Petri kutularının ekim yapılmış olduğu tüpler pozitif olarak değerlendirilir.

-Ozmofilik-ozmotolerant maya analizinde agar tabakasının yukarı itilmesi gaz oluşumunun göstergesidir. Bu şekildeki tüpler pozitif olarak değerlendirilir.

Aşağıda tüplerin değerlendirilmesi için bir örnek verilmiştir. Bu örnekten izleneceği gibi ardışık 4 seyreltiden ekim yapılmış, koliform grup için 3 3 2 1 şeklinde muhtemel pozitif sonuç elde edilmiş, sadece pozitif sonuç veren tüplere doğrulama testi yapılmış ve bu kez 3 3 1 1 şeklinde sonuç elde edilmiştir. Doğrulanmış koliform tüplerinde ise *E. coli* varlığı araştırılmıştır.

Şekil 15. Sıvı bir gıdada *E. coli* 'nin IMViC testleri ile belirlenmesi

10^0			10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}			Seyreltmeler
U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	Her seyreltmeden 3'er tüpe ekim.
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	Koliform grup bakteriler için muhtemel pozitif sonuçlar 3 3 2 1.
U	U	U	U	U	U	*	U	U	U	*	*	Sadece pozitif sonuçlar doğrulanır.
+	+	+	+	+	+	*	+	-	+	*	*	Koliform grup bakteriler için doğrulanmış sonuçlar 3 3 1 1.
O	O	O	O	O	O	*	O	*	O	*	*	EMB Agar ve IMViC Testleri.
-	+	+	+	-	-	*	-	*	-	*	*	<i>E. coli</i> için pozitif sonuçlar 2 1 0 0.

*: Bir önceki basamakta negatif sonuç olduğu için ekime gerek yoktur.

Doğrulanmış koliform sayısı dikkate alındığında 10^0 serisinden başlanırsa 3 3 1 kodu karşılığı sonuç 46 EMS/mL iken, 10^{-1} seyreltiden elde edilecek sonuç 3 1 1 kodu karşılığı 75 EMS/mL'dir. Çizelge 06'ya göre gerek 3 3 1 gerek 3 1 1 kodu "1" kategorisi ile değerlendirilse de ardışık seride seçim kuralına göre 3 3 1 değil, 3 1 1 serisi esas alınır ve sonuç 75 EMS/mL olarak verilir. Benzer durum *E. coli* için de geçerlidir ve 2 1 0 kodu karşılığı olarak sonuç 1,50 EMS/mL olarak verilir.

07.02.04. EMS Yönteminde Sonuçların Verilmesi

Standart EMS çizelgesinden sonuç hesaplandıktan sonra sıvı gıdalarda (örneğin 0,36) EMS/mL, katı gıdalarda (örneğin 23,0) EMS/g olarak verilir. Ekim yapılan seyreltilere göre EMS çizelgesinin kullanılışı yukarıda açıklanmıştır. Ekimi yapılan tüplerdeki pozitif sayılara göre elde edilen kodların karşılığı aşağıdaki örneklerde verilmiştir. Hesaplamalarda standart 1-0,1-0,01 mL EMS çizelgesi kullanılmıştır.

EMS yönteminde standart olarak 1:9 seyrelti kullanılmaktadır. Bununla birlikte, unda rop sporu sayımında olduğu gibi ilk seyreltme 1:19 oranında yapılabilir, ancak diğerleri mutlaka standart 1:9 oranında yapılmalıdır. Bu şekilde yapılan bir seyreltme ve ekimden sonra 3 1 0 kodu elde edilirse bunun çizelgedeki karşılığı 4,30'dur ve 1-0,1-0,01 mL ekim için bu değer verilmiştir. Buna göre 1:19 olarak hazırlanan ilk seyreltide 4,30 EMS/mL sayım sonucu elde edilir, bu değer 20 ile çarpılarak örnekteki sayı 86,0 EMS/g olarak verilir. Diğer bir deyiş ile burada 1:19 olarak yapılan ilk seyreltme sanki orijinal (10^0) örnek gibi düşünülmektedir. Bundan 1:9 standart seyreltmeler yapıldıktan sonra standart yöntemle seyreltilerden (10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2}) 1'er mL ekim yapılmış ve 4,30 EMS/mL sayım sonucu elde edilmiştir. Burada orijinal olarak kabul edilen tüp (bir anlamda un homojenizati), gerçekte orijinal örneğin 20 kez seyreltilmiş şekli olduğu için, 4,30 değeri 20 ile çarpılarak gerçek sonuç bulunmaktadır.

Aşağıda (çizelge 07) EMS yönteminde sonuçların verilmesine ilişkin örnekler verilmiştir.

Çizelge 07. EMS Sonuç Örnekleri

İlk seyrelti ve ekim	Kod	Sonuç
10^0 ; standart	000	<0,3 EMS/mL
10^0 ; standart	200	0,92 EMS/mL
10^0 ; standart	333	>110 EMS/mL
10^0 ; ilk seyreltiden 10'ar mL	200	0,092 EMS/mL
10^{-1} ; standart	000	<3,0 EMS/g
10^{-1} ; standart	200	9,20 EMS/g
10^{-1} ; standart	333	>1100 EMS/g
10^{-1} ; ilk seyreltiden 10'ar mL	200	0,92 EMS/g

07.03. Membran Filtrasyon

07.03.01. Genel Bilgiler

Membran filtrasyon sistemi özellikle içme suyu ve berrak meyve suları gibi filtrasyonda sorun çıkarmayan ve çok az sayıda mikroorganizma bulunabilen örnekler için idealdir. Benzer şekilde suda tam olarak eriyebilen şeker, tuz gibi gıdaların analizinde de kolaylıkla kullanılmaktadır.

Bir sterilizasyon tekniği olarak membran filtrasyon konusu 04.04. Bölümde verilmiştir. Membran filtrasyon yöntemi ile sayımın ilkesi de sterilizasyona benzer; analiz edilecek materyaldeki mikroorganizma filtre üzerinde kalır.

Her ne kadar mikrobiyolojik kurallar uyarınca membran filtrasyon yöntemi, 1 kob/g (mL)'dan daha az sayıda mikroorganizma içeren gıdaların analizi için uygun bir yöntem ise de (bakınız; 06.01.01. Bölüm), pratik kullanımı nedeni ile gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında bundan çok daha fazla sayıda mikroorganizma içeren gıdaların analizinde de yaygın kullanım alanı bulmuştur.

Bu yöntemde seyreltme kavramı ile yıkama amacıyla kullanılan steril sıvının hesaplamalarda karıştırılmamasına özen gösterilmelidir. Örneğin, toz şekerin 1 gramında 60 adet canlı (koloni oluşturabilen) bakteri olduğu varsayılır ise 1 gram şekerin 9 mL ya da 43 mL seyreltme sıvısında eritilmesinin "seyreltinin tümünün filtreden geçirilmesi koşulu ile" hiç farkı yoktur. Her koşulda 1 gramdaki 60 adet bakteri filtre yüzeyinde kalacak ve inkübasyon sonunda 60 koloni oluşacaktır. Oysa, 1 gram şekerin 9 mL seyreltme çözeltisinde eritilmesi ve buradan (10^{-1} seyrelti) 1 mL aktarılması durumunda sadece 6 bakteri filtre üzerinde kalacaktır.

Bu uygulamada, filtrasyonun kolaylaştırılması amacıyla sisteme önceden ilave edilen ya da filtrasyon bitiminde haznede kalmış olabilecek bakterilerin de filtreye aktarılması için kullanılan steril saf suyun miktarı önemli değildir. Çünkü bu su sterildir, önemli olan filtre edilecek örnek miktarıdır.

İçme suyu analizinde genellikle 100 mL su örneği filtre edilir. Yukarıdaki örnekte olduğu gibi, filtreyi ıslatmak amacıyla önceden ilave edilen steril su miktarı önemli değildir, burada sadece 100 mL analiz örneğinin geçirildiği dikkate alınmalıdır. Bu içme suyu yüksek miktarda klorlanmış ise klor da filtre üzerinde kalacak ve mikroorganizma gelişmesini baskılayacaktır.

Bunun önüne geçmek için analiz edilecek örnek filtreden geçirildikten sonra, bol miktarda steril su ya da özel olarak bu amaçla hazırlanmış Membrane Filter Rinse Fluid (Merck 1.05286) geçirilerek filtre bir anlamda yıkanır.

Filtrasyon sonunda membran filtre, üretici firma tarafından sağlanan ve özel olarak üretilmiş besiyerine konulabileceği gibi, laboratuvarında standart olarak hazırlanan katı besiyeri üzerine de yerleştirilebilir.

Membran filtre sıvı besiyerine de ilave edilebilir. 100 mL dere suyunda *Salmonella* olup olmadığının araştırılmasında en pratik yol 100 mL dere suyunu filtre edip, filtreyi olduğu gibi standart yöntemle hazırlanmış zenginleştirme besiyerine atmaktır. Standart analizlerden farklı olarak bu uygulamada 225 mL besiyerine gerek yoktur, 40–50 mL besiyeri yeterlidir.

FDA ve diğer bazı kuruluşlar tarafından "Hidrofobik Grid Membran Filter" (HGMF; hidrofobik ızgara sistemli membran filtre) tekniği uygulanmaktadır. Bu sistemde filtre üzerinde çok ince hidrofobik şeritler vardır. Bu şeritler hidrofobik oldukları için üzerlerinde su ve dolayısıyla mikroorganizma tutulmaz, böylece koloni gelişmesi bu şeritlerin oluşturduğu karelerin içinde meydana gelir.

Bu sistemde kare içindeki koloni sayısına bakılmaz. Kareler, pozitif (koloni gelişmiş) ya da negatif (koloni yok) olarak değerlendirilir ve formül ile hesaplanan sonuç EMS olarak verilir. Daha çok ABD'de -ve özellikle akademik çalışmalarda- benimsenen bir yöntem olup, Avrupa ülkelerinde yaygın kullanım alanı bulmamıştır.

Söz konusu formül; "Gelişme Görülen Bölmelerdeki En Muhtemel Sayı" (Most Probable Number of Growth Unit; MPNGU) olarak ifade edilmektedir:

$EMS = \{N \times \ln [N / (N - A)]\}$ şeklindedir.

Bu formülde N= membran filtre üzerindeki toplam kare sayısı ve A= pozitif olarak sayılan kare sayısıdır.

Formüle göre toplam kare sayısının, toplam negatif kareye ($N - A$) bölünmesi ile elde edilen sayının "e" tabanına göre logaritması ($\ln$) toplam kare sayısı ile çarpılmaktadır.

HGMF sisteminde koloni değil alan sayıldığı için filtre üzerinde ideal olarak 20–1520 pozitif saha sayılması gerekir. Bu sınırların dışındaki sayımlarda ekimin tekrarlanması önerilmektedir. Prensip olarak, gözle yapılan sayımlarda pozitif alan sayısı 200'ü geçmiyor ise pozitif alanların tümünün sayılması gerekmektedir. Bu değeri aşan sayımlar için, her biri 40 alan olmak üzere yatay ve dikey boyutta 4'er hat boyunca sayım yapıp, sonucun 5 ile çarpılması önerilmektedir.

Kayısı suyu gibi partiküllü örneklerde membran filtrasyon uygulamasında filtre tıkanır. Ön filtre ve enzim uygulaması gibi önlemler söz konusu ise de özellikle enzim uygulaması pratik uygulamada yeterli değildir.

Ön filtre uygulamasında homojenizat ya da sıvı gıda, asıl filtrenin üzerine yerleştirilen 8 µm porlu filtreden geçirilir, kaba parçalar burada tutulur. Bu filtrenin de besiyerine yerleştirilmesi ve inkübasyon sonunda her iki filtreden elde edilen sonucun toplanması gerekir. Tripsin, selüloz, amilaz, proteaz vb. enzimler ile Tween 80 gibi emülgatörler tek başına ya da kombine olarak kullanılır.

07.03.02. Membran Filtrasyon Yönteminin Uygulanışı

Membran filtrasyon yönteminin uygulanışı aşağıda özetlenmiş, ayrıca "Membran Filtrasyon Yöntemiyle Sularda Koliform Bakteri Aranması" şematik olarak Ek A 05'te verilmiştir.

-Membran filtrasyon sistemi sterilize edilir. Sterilizasyon işlemi, ekipmanın özelliğine göre otoklavda yapılabildiği gibi, pratik olarak alkol ya da uygun bir kimyasal kullanılarak da yapılabilir. Otoklavlama parametresi 121 °C'da 20 dakika iken, kimyasal dezenfeksiyon uygulanırsa dezenfektanın kolaylıkla sistemden uzaklaştırılması gerekir. Aksi halde; sistemde kalan dezenfektan, analizi yapılacak mikroorganizma üzerinde olumsuz etki oluşturur.

-Bu nedenle, alkol uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısmının yakılarak giderilmesine ek olarak, analiz öncesinde 50 mL kadar steril damıtık suyun filtre edilmesi, sistemde kalabilen dezenfektanın yıkanması için etkili bir uygulamadır.

-Aseptik koşullara uyularak filtrenin yerleştirileceği taban steril su ile ıslatılır ve filtre buraya yerleştirilir. Koruyucu plastik tabaka kendiliğinden kalkar, bu kısım filtreden ayrılır. Sonra süzme haznesi yerine takılır.

-Beklenen ya da hedef sayıya uygun miktarda sıvı hazneye konulur, pompa çalıştırılır ve sıvı örnek membran filtreden geçirilir.

-Süzme işlemi tamamlandıktan sonra çeperlerde kalmış olması muhtemel mikroorganizmaların da alınması için 10–20 mL kadar steril su ile çalkalanır. İlave steril su geçirme işlemi, klor gibi inhibitör maddelerin varlığında daha da önemlidir.

-Filtrenin mikroorganizmaların tutulmuş olduğu yüzeyi üstte kalacak şekilde Petri kutusundaki besiyerine yerleştirilir. Petri kutuları, tabanları alta gelecek şekilde inkübasyona bırakılır.

-Besiyeri olarak ped üzerine emdirilmiş hazır besiyeri kullanılıyor ise üretici firmanın talimatı doğrultusunda steril su ilave edilerek besiyeri aktifleştirilir.

07.03.03. Membran Filtrasyon Yönteminde Sonuçların Verilişi

Membran filtreden fiilen geçirilen miktar esas alınarak sonuçlar kob/mL ya da kob/g olarak verilir. Aşağıda çeşitli örnekler verilmiştir:

-100 mL su örneği filtre edilmiş ve sonuçta 24 koloni sayılmış ise sonuç 24 kob/100 mL olarak verilir.

-5 gram şeker 45 mL steril seyreltme çözeltilisinde eritilmiş, buradan alınan 5 mL filtreden geçirilmiş ve 17 koloni sayılmış ise; filtrasyon öncesinde 10^{-1} seyreltme yapılmış demektir. Bu çözeltilinin her mL'sinde 0,1 gram ve 5 mL'sinde ise 0,5 gram şeker vardır. 17 koloni 0,5 gramdan elde edildiğine göre, sonuç 34 kob/g olarak verilir.

-100 mL su örneği filtre edilmiş ve koloni gelişmesi görülmemiş ise sonuç <1 kob/100 mL olarak verilir. Yaygın uygulamada bu sonuç "yok/100 mL" olarak da verilmektedir.

-100 mL dere suyunda *Salmonella* aranması amacıyla yapılan filtrasyondan sonra filtre 50 mL kadar ön zenginleştirme besiyerine atılıp, buradan standart *Salmonella* analizi ile selektif zenginleştirme, selektif katı besiyeri, tipik kolonilerin tanımlama aşamaları ile örnekte *Salmonella* var/yok testi yapılmış olur. Görüldüğü gibi burada membran filtrasyon tekniği bir anlamda var/yok testinin bir bölümü olarak kullanılmaktadır. 100 mL su analizinde filtre doğrudan besiyeri üzerine konularak sayım yapılır. Ancak buradaki uygulamada sıvı besiyeri kullanıldığı için analiz prensibi değişmektedir.

07.04. Titre Belirlenmesi

Örnekteki mikroorganizma düzeyini "pozitif sonucun alındığı en seyreltik seyrelti" ile belirleyen bir yöntemdir. Rutin test dilüsyonu adı ile de bilinir.

Yöntemin uygulanmasında materyalden, önce standart seyreltiler hazırlanır. Seyreltmenin hangi basamağa kadar gideceği amaca ya da beklenen/kabul edilen sayıya göre değişir.

Seyreltmeler yapıldıktan sonra her tüpten ayrı ayrı olmak üzere, içlerinde uygun besiyeri bulunan tüplere 1'er mL örnek aktarılır. Uygun sıcaklık, süre ve atmosfer ortamında inkübasyondan sonra tüplerin pozitif ya da negatif oldukları kontrol edilir. Değerlendirme kuralları EMS yöntemindeki gibidir.

Aşağıda LST+MUG besiyerinde koliform bakteriler ve *E. coli* için titre belirlenmesi üzerine bir örnek verilmiştir. Bu besiyerinde koliform bakteriler ve *E. coli* 'nin beraberce belirlenmesi tekniği 14.03. Bölümde verilmiştir:

Çizelge 08. Titre Belirlenmesi için Örnek

Bakteri	Seyreltiler			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Koliform Grup	+	+	+	-
<i>E. coli</i>	+	-	-	-

Bu örnekte koliform grup bakteriler 10^{-3} seyreltiye kadar (+) sonra (-) sonuç vermiş, *E. coli* ise sadece 10^{-1} seyreltide (+) ve diğer seyreltilerde (-) sonuç vermiştir. Bu sonuca göre analiz edilen örnekte koliform grubun titresi 10^3 ve *E. coli* titresi 10^1 olarak verilir.

Seyreltme standart 1:9 şeklinde yapılabileceği gibi, amaca göre 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 şeklinde de yapılabilir. Bu koşulda sonuç, 1/8 (seyreltme oranı) ya da 8 (8 defa seyreltildiğinde hala pozitif sonuç alınıyor) şeklinde verilir.

Titre belirlenmesi, faj düzeyi (faj titresi), antikor düzeyi (titresi) belirleme vb. gibi çalışmalarda da kullanılır. Özellikle antikor titresi belirleme çalışmalarında seyreltme, sıklıkla 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 şeklinde yapılmaktadır.

07.05. Metabolizmaya Dayalı Hızlı Analizler

Genellikle hızlı analiz amacıyla kullanılan testlerdir. Empedans ya da kondüktans ölçümü, CO₂ oluşumunun belirlenmesi, resazurin indirgenmesi, metilen mavisi indirgenmesi, besiyerinin renk değiştirmesi vb. şekillerde yapılabilir.

Bunlar arasında; çiğ sütün mikrobiyolojik analizinde çok uzun süre kullanılmış ve halen koruyucu madde katılmamış sütlerde bu amaçla kullanılan metilen mavisi indirgenme testi burada örnek olarak verilmektedir.

Analizi yapılacak sütün 10 mL'si steril bir tüpe alınır, üzerine filtre ile sterilize edilmiş 50 ppm metilen mavisi çözeltisinden 1 mL ilave edilir ve tercihen su banyosunda 37 °C'da inkübasyona bırakılır. Sütte bulunan bakterilerin gelişmesi sonunda mavi renkli boya indirgenip, renksiz olur ve süt, beyaz rengine döner. Doğal olarak çiğ sütte bulunan bakteri sayısı başlangıçta ne kadar fazla ise metilen mavisinin tümüyle indirgenmesi için gereken süre o denli kısa olacaktır. Bir diğer deyiş ile bakteri sayısı ile sonucun alındığı süre ters orantılıdır.

Bu ilişki, bir seri deneme ile standart sayım amacı ile de kullanılabilir. Farklı mikrobiyolojik kalitelerde olan çiğ sütlere metilen mavisi indirgeme testi uygulanır ve indirgeme süresi belirlenip, buna paralel olarak aynı çiğ süt örneklerinde toplam mezofil bakteri sayımı yapılır. Sayım sonuçlarının logaritması, metilen mavisi indirgeme süresine göre grafik haline getirilir. Grafiği, güvenilir bir şekilde elde etmek için önerilen en düşük sayı 25'tir.

Grafik basit olarak bilgisayarlarda bulunan MS Excel ya da benzeri bir program ile kolaylıkla çizilebilir. Grafik elde edildikten sonra yapılacak iş sadece, metilen mavisi indirgeme süresine karşı kaç adet bakteri bulunduğunu grafikten hesaplamaktır. Ayrıca grafiğe gerek olmadan basit istatistiksel regresyon formülleri ile de süreye karşı gelen bakteri sayısı hesaplanabilir.

Metilen mavisi indirgeme vb. metabolizmaya dayalı tüm hızlı testler üzerinde temel sakınca, popülasyondaki bakterilerin metabolik aktivite farkıdır. Analizi yapılan üründe metabolik aktivitesi yüksek olan az sayıda bakteri varsa, analiz sonucu yüksek sayıda bakteri olarak elde edilecektir. Buna karşı görüş ise "asıl önemli olan, çiğ sütteki bakteri sayısının değil, mevcut bakterilerin metabolik aktivitesine bağlı olarak sütün bozulma potansiyelinin belirlenmesidir" şeklindedir ve bu karşı görüş de geçerlidir. Ayrıca, sütte antibiyotik benzeri maddeler varsa, bakteri sayısı yüksek olmasına karşın indirgeme süresi uzar ve yanıltıcı sonuçlar alınır. Resazurin indirgemeye bağlı bakteri sayımı da bu şekilde yapılır.

Bir başka örnek, sularda enterokok analizi için kullanılan Chromocult Enterococci Broth besiyerinin renginin değişmesidir. Eğer enterokok varsa besiyeri rengi sarıdan mavi–yeşile döner. Sudaki enterokok varlığı ne kadar fazla ise bu renk dönüşümü o denli hızlı olur. Bir seri ön deneme ile başlangıç bakteri sayısına göre renk dönüşüm süresi belirlenerek, basit bir grafik çizilir ve asıl testlerde renk dönüşüm süresine göre örnekteki başlangıç bakteri yükü çok kaba sınırlar içinde tahmin edilebilir. Gözle yapılan bu değerlendirmeye pek güvenmemek gerekir.

Metabolizmaya dayalı hızlı analiz yöntemlerinin ticari steril ürünlerde sayım yerine var/yok testi amacı ile kullanılması çoğu kez daha anlamlıdır. Her ne kadar bu ürünlerde biyolojik stabilite testi çok daha önemli ise de, beklenmedik bir kontaminasyonun hızla belirlenmesi amacı ile bu testler de uygulanmaktadır.

07.06. Mikroskopik Sayımlar

Mikroskopik sayımların 4–5 dakika içinde sonuç alınabilmesi ve kültürel yöntemlerle kıyaslandığında maliyetinin yok denilecek kadar düşük olması gibi çok önemli 2 üstünlüğü olmakla birlikte, canlı ve ölü mikroorganizmaların beraberce sayılması gibi bir dezavantajı olması nedeni ile yaygın olarak kullanılmamaktadır. Her ne kadar, Thoma lamı ile maya sayımında metilen mavisi çözeltisi uygulanarak yapılan basit preparatta canlı (renksiz) ve ölü (mavi renkli) hücreler ayrı ayrı sayılabilmekte ise de, bu uygulama sadece şarap ve bira yapımı ile ekmek mayası üretiminde kullanılmaktadır. Sütte Breed yöntemi ile yapılan direk mikroskopik sayım sütün genel kalitesi hakkında bilgi verir.

Aşağıda temel mikroskopik sayımlar verilmiştir.

07.06.01. Breed Yöntemi

Çiğ sütte bakteri sayısını belirlemek için kullanılır. Yöntem uyarınca canlı ve ölü bakteriler beraberce sayılır. Her ne kadar gıda sanayisini ilgilendiren canlı bakteri sayısı ise de Breed yöntemi ile elde edilen değerin yüksek ya da düşük olarak elde edilmesi sütün kalitesi hakkında oldukça iyi bir fikir verir.

Yöntemin esası, 0,01 mL sütün bir şablon yardımı ile belirlenmiş 1 cm² alana yayılması, kurutulması ve boyandıktan sonra mikroskopta incelenmesidir. Görüş sahası çapı objektif mikrometre yardımı ile ölçülür ve görüş alanı hesaplanır. Sonra, 1 cm² alanda kaç adet mikroskop görüş alanı olduğu basitçe hesaplanır ve bu değer "mikroskop faktörü" olarak kaydedilir.

Bu faktör, mikroskopun objektifi, oküleri ve bazı mikroskoplarda olduğu gibi tüp boyu değiştirilmezse sabit kalır.

Herhangi bir nedenden ötürü mikroskop faktörü bilinmiyorsa 4.000 olarak kabul edilir, ancak bu durumda analiz sonucu "tahmin" olarak verilir. 10X oküler, 100X objektif ve standart olarak 160 mm tüp uzunluğu kullanıldığında mikroskop faktörü 2.500–5.500 (çoğunlukla 3.500–4.500) arasında bir değer olarak hesaplanmalıdır. Bu sınırların dışında bir değer elde edilirse nedeni araştırılmalı ve düzeltici faaliyet olarak kayıtlara geçilmelidir.

Sayım, farklı alanlarda yapılır ve prensip olarak ne kadar az bakteri görülüyorsa o kadar fazla alanda sayım yapılır. Mikroskop faktörü 4.000 olan mikroskopta görüş sahası ortalamasında 1 ve daha az bakteri varsa 40 saha, 1–10 bakteri varsa 20 saha ve 10'dan daha fazla bakteri varsa 10 saha sayılmalı ve ortalaması alınmalıdır.

Breed yönteminde zincir formundaki bakterilerin sayılmasında bir özellik vardır. Bunlar ikili ya da daha uzun zincirli de olsa 1 adet olarak sayılır. Bunun nedeni ise "eğer bu zincirdeki bakteriler canlı olsa idi, katı besiyerinde bunlardan sadece 1 adet koloni oluşurdu" şeklindeki yaklaşımdır.

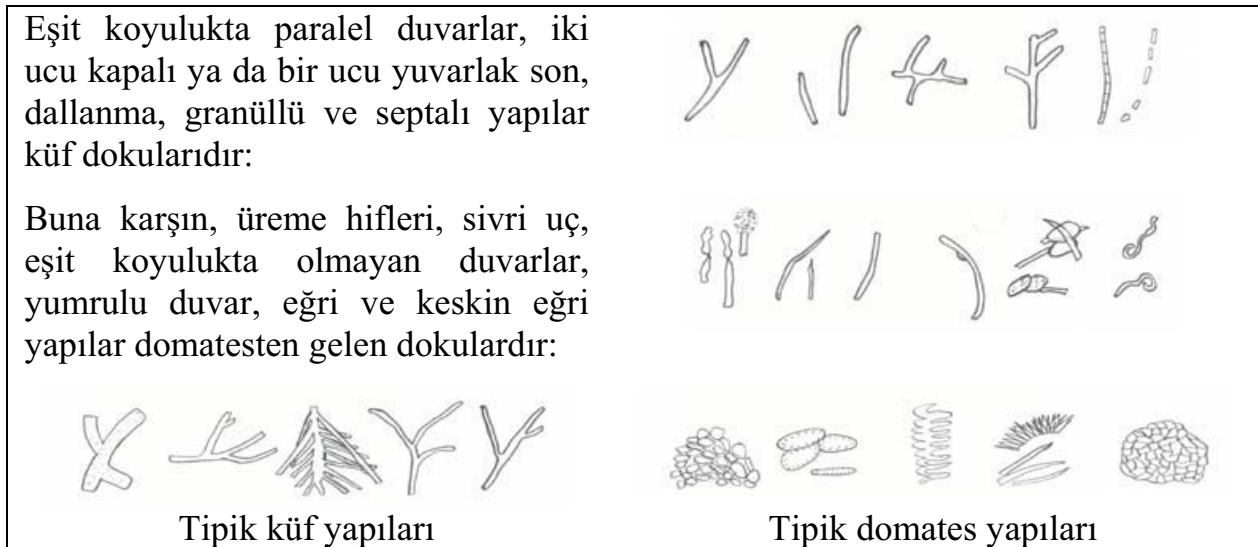
Sayım sonucu $A \times MF \times 100$ formülü ile elde edilir. Burada; A: ortalama bakteri sayısı, MF: mikroskop faktörü ve 100: 0,01 mL'yi 1 mL'ye çevirmek içindir.

07.06.02. Howard Lamı

Başta domates ürünleri olmak üzere ham madde kalitesi hakkında bilgi veren ve özellikle ticarete halen çok geçerli olan bir yöntemdir. Analiz, 25 görüş sahası olan özel bir lamda yapılır. Amaç, incelenen görüş sahasının küf miselleri açısından (+) ya da (-) olarak değerlendirilmesi ve buna göre analiz edilen örnekte küflü saha oranının belirlenmesidir. Sonuçlar "% küflü" saha olarak verilir. Son zamanlarda şeftali ve kayısı konsantreleri ile nektarlarında küf açısından ham madde kalitesinin değerlendirilmesi için de kullanılmaktadır.

Howard küflü saha sayımında en büyük zorluk, incelenen sahanın (+) ya da (-) olarak değerlendirilmesidir. Ham maddelerden gelen dokular küf hifi olarak değerlendirilebileceği gibi, bunun tersi de geçerlidir. Bu nedenle oldukça deneyim isteyen bir yöntemdir. İki veya daha fazla preparatta 25'er saha sayılıp, pozitif saha sayısı belirlenir. Şekil 16'da domates ve küf doku örnek verilmiştir.

Şekil 16. Howard Lamı için Tipik Domates ve Küf Görüntüleri



Eğer saha içinde 3'ten daha fazla küf flamenti varsa ya da 3'ten daha az sayıdaki flamentlerin uzunluğu görüş sahası çapının 1/6'sından daha fazla ise bu görüş sahası pozitif olarak değerlendirilir.

07.06.03. Thoma Lamı

Hemositometre adı ile de bilinen özel bir lam aracılığı ile gıda mikrobiyolojisinde maya, klinik birimlerde sperm ve kan sayımlarında kullanılan bir yöntemdir. Lam üzerinde önceden açılmış bölmeye sıvı konulup, lam kapatıldığı zaman bu bölmede tam olarak $0,1 \text{ mm}^3$ hacim kalır. Sayım 20X ya da 40X objektif kullanılarak bu bölmede yapılır.

Thoma lamındaki $0,1 \text{ mm}^3$ hacim; kenarları $0,05 \times 0,05 \text{ mm}$ ve derinliği $0,1 \text{ mm}$ olan ve 20×20 şeklinde yerleştirilmiş 400 küçük kare prizmadan oluşur. Bu kare prizmalar, çok genel olarak "kare" adıyla anılır. Sayım kolaylığı açısından 400 küçük kare 16 büyük kareye bölünmüştür.

Sayım sonucu $A \times SF \times 10.000$ formülü ile elde edilir. Burada A: $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayılan maya, SF: yapıldı ise seyreltme faktörü ve 10.000: $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde elde edilen değeri 1 mL'ye çevirmek için kullanılan sabittir.

Thoma lamı ile sayım genellikle maya hücreleri için yapılır. Bunun nedeni 20X ya da 40X objektif kullanıldığında mikroskop görüş derinliğinde ancak mayaların görülebilmesidir. Bakteriler, 20X ya da 40X objektiflerle görülemez. 100X objektif kullanılırsa $0,1 \text{ mm}$ olan görüş derinliğinde incelenmeleri oldukça güçtür ve her görüş sahasında farklı görüş derinliklerinin incelenmesi gerekir.

Bakterilerin sayımı için derinliği Thoma lamından 5 kez daha az ($0,02 \text{ mm}$) olan Petroff–Hausser lamı kullanılır. Bu lamda maya sayımı daha kolay olarak yapılır.

Thoma lamında sayım sırasında maya hücreleri boyanmaz. Basit preparat tekniği ile sayım yapılır. Hücre kültürüne 1 damla metilen mavisi çözeltisi (50 ppm) damlatılması ile canlı ve ölü maya hücrelerini ayırt etmek mümkündür.

Canlı hücreler metilen mavisini indirgeyerek renksiz görülürken ölü hücrelerde bu enzim aktivitesi olmadığı için maviye boyanmış olarak kalırlar. Pratikte yaygın kullanılmasına rağmen, güvenilir bir yöntem değildir ve Thoma lamının canlı ve ölü hücre sayım sonucunu beraberce vereceği unutulmamalıdır.

Sayım kolaylığı olması açısından 400 küçük karenin 16 büyük kare içinde toplanma yöntemi çoğu kez yanılığa neden olmaktadır.

Thoma lamında büyük kareler ara çizgi ile belirtilmektedir. Ara çizginin sağ, solu, altı ve üstü olarak tanımlanan büyük kare alanları yerine, ara çizgi görülen bölgeler 16 küçük kareden oluşan alanlar olarak değerlendirilebilir. Sonuçta $16 \times 25 = 400$ küçük kare yerine $16 \times 16 = 256$ küçük karede sayım yapılmış olacağına göre, sayım sonucu $400 / 256 = 1,5625$ ile çarpılarak 400 küçük kareye çevrilmiş olur.

07.06.04. Direk Epifloresan Filtre Tekniği (DEFT)

1980'li yıllardan beri uygulanan DEFT yönteminde gıda örnekleri analiz için bir seri işlemle analize hazırlanır, membran filtreden geçirilip, fluorokrom boyalar ile boyanır ve epifloresan mikroskop ile incelenir. Filtrenin uygun bir katı besiyerinde 3–6 saat inkübasyonu ve sonra boyanıp incelenmesi ise mikrokoloni DEFT olarak tanımlanır ve bu yöntemde sadece mikrokoloniler sayılacağı için örnekteki canlı hücre sayısı belirlenebilir. Antikorların floresan boyalar ile entegrasyonu sayesinde tür bazında sayım da söz konusudur. Mikrokolonilerin antikor içeren floresan boyalar ile boyanıp incelenmesi hızlı bir analiz yöntemi olarak değerlendirilir.

DEFT'in en büyük avantajlarından birisi filtreden geçirilmeye bağılı olarak az sayıda mikroorganizma içeren örneklerde de sayımın güvenilir olmasıdır.

07.07. Canlandırma

Mikrobiyolojik analizlerde -özellikle işlem görmüş gıdalar- doğrudan analize alınırsa "var/yok testlerinde sahte negatif" ya da "gerçekte olduğundan daha az" sayım sonucu alınabilir. Bunun temel nedeni, basit bir kurutma ya da soğutma işlemi sırasında mikroorganizmaların ölmemesi, ancak ciddi şekilde "ağır" yaralanması, stres altına girmesidir.

Bu gibi işlemler sonucunda mikroorganizmaların bir kısmı normal aktivite ile yaşamlarına devam eder, bir kısmı temel yaşam fonksiyonlarını az bir hasar ile sürdürür, bir kısmı bu yaşam fonksiyonlarını kayda değer ölçüde "ağır yaralanmış olarak" yitirir. Ancak bunlar halen "canlıdır" ve bir kısmı sonra ölür.

Standart mikrobiyolojik analizler sırasında yaşamlarını normal olarak sürdüren ve "az hasarlı" olanlar kolaylıkla belirlenir iken, "ölmüş" olanlar zaten analiz ile belirlenemez. Asıl sorun "ağır yaralı" olanların belirlenmesidir.

Toplam mezofil aerob bakteri sayımı gibi bir analizde bu tip bakteriler belirlenebilir. Buradaki tek olumsuzluk katı besiyerinde kısıtlı serbest su nedeni ile ağır yaralı bakterilerin gelişiminde bir zorlanma olmasıdır.

Ancak, *Listeria* var/yok testinde olduğu gibi, doğrudan selektif besiyerine ekim sonunda bu bakterilerin gelişip analiz sonucunu "var" olarak göstermeleri beklenemez. Selektif besiyerleri bu tip "ağır yaralı" bakterilerin gelişmesine izin vermez. Hatta bu gibi mikroorganizmaların ölmesine neden olur. Her ne kadar, selektif besiyerlerinde asıl amaç refakatçi floranın baskılanması ise de, çoğunlukla hedef bakteri üzerinde de minimum düzeyde olumsuz etkisi olmaktadır.

Hedef bakteri ne denli stres altında ise, bu olumsuz etki o denli yüksek olur ve hatta analizde negatif sonuç alınır. Oysa, bu bakteriler depolama süreçlerinde "kendilerini tedavi ederek" eski aktivitelerini kazanır ve hastalık yapabilir. Bu durumda önemli olan bu bakterilerin standart analiz ile belirlenmesidir.

Canlandırma adı verilen bu işlem özellikle var/yok testi ile analizi yapılan patojenlerin selektif besiyerinde belirlenmesi için uygulanmaktadır. Ayrıca, standart "toplam mezofilik aerobik bakteri" ve "toplam Enterobacteriaceae" gibi sayımlarda da uygulanabilir. Enterobacteriaceae familyası üyelerinin canlandırma yöntemi ile sayımı 16.03. Bölümde verilmiştir. Çok tipik bir örnek olmasına bağlı olarak bu uygulama aşağıda şematik olarak da açıklanmıştır.

Şekil 17. Canlandırma Yöntemi ile Enterobacteriaceae Sayımı (EMS)

10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}			Seyreltmeler
U	U	U	U	U	U	U	U	U	Her seyreltmeden 3'er TPS tüpüne ekim.
+	+	+	-	+	+	+	-	-	Bulanıklık olan tüplerden EE Broth'a ekim.
U	U	U	*	U	U	U	*	*	Bulanıklık olan tüplerden VRBD Agar'a sürme.
O	O	O	*	O	O	O	*	*	Tipik kolonilerin belirlenmesi.
+	+	+	*	-	+	-	*	*	Enterobacteriaceae için pozitif sonuçlar; 3 1 0

Salmonella analizinde "selektif olmayan besiyerinde ön zenginleştirme" işlemi aslında basit bir canlandırma işlemidir. Buna göre canlandırma işlemi selektif olmayan ortamlarda (besiyeri, inkübasyon sıcaklığı vb.) yapılır.

Canlandırma işleminde dikkat edilmesi gereken en önemli ayrıntılardan birisi, diğer mikroorganizmaların (refakatçi flora) gelişerek hedef mikroorganizmanın gelişimini engellemesidir. Bu nedenle canlandırma işlemi gereğinden uzun süreli yapılmamalıdır. *Salmonella* 'da olduğu gibi ön zenginleştirme işleminde bu açıdan tartışmalar ve yöntem geliştirme çalışmaları devam etmektedir. *Salmonella* analizi sırasında uygulanan "selektif olmayan ön zenginleştirme" aşamasında refakatçi flora yüksek miktarda asit oluşturursa stres altındaki bakteri bundan kayda değer ölçüde olumsuz şekilde etkilenir. *Salmonella* aside duyarlı bir bakteridir.

Uzun süreli canlandırma işlemi katı besiyerinde sayım öncesinde yapılacak ise sayım sonucunu etkilemeyecek kadar kısa tutulmalıdır. Bu amaçla 30 dakikalık canlandırma işlemi çoğunlukla yeterlidir.

Listeria analizinde canlandırma işlemi için selektif zenginleştirme besiyerine selektif katkı maddeleri ilave edilmeden 4 saat inkübasyon kayda değer bir canlandırma sağlamaktadır. Benzer uygulama *E. coli* O157:H7 analizi için de önerilmektedir. Canlandırma işlemi özellikle patojenlerin analizinde önemlidir.

07.08. Var/Yok Testleri

"Analiz edilen örnekte hedef mikroorganizma sayısı 0 olmalıdır" şeklindeki standartlara uyulup uyulmadığının kontrolünde uygulanır. Bu analizlerde sayı "0" değilse ne olduğu önemli değildir. Örneğin, gıdalarda *Salmonella* analizi var/yok testi ile yapılır. 25 g (mL) gıdada *Salmonella* olmamalıdır. Varsa, sayısı önemli değildir, ancak başka mikroorganizmalara belirli sayılarda izin verilebilir.

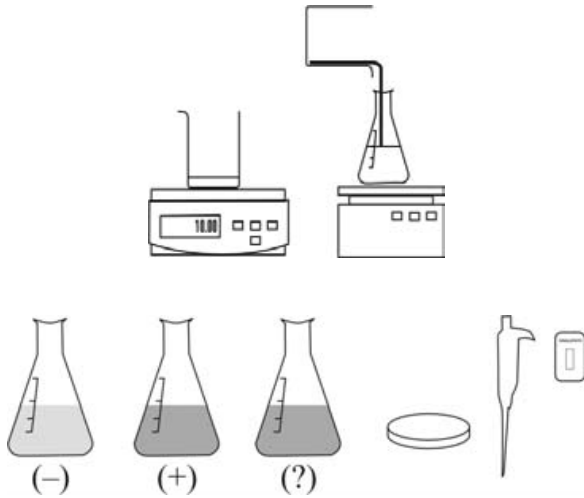
Yukarıda membran filtrasyon uygulamasında verilen son örnekte olduğu gibi amaç 100 mL su örneğinde bakteri olmaması ise, basit olarak örnek filtreden geçirilir, inkübasyon sonunda filtre üzerinde hiç koloni olmaması beklenir.

Bu analiz sonucunda filtre üzerinde koloni gelişmesi görülürse işletmeye gelen suyun mikrobiyolojik kalitesinin ne denli bozuk olduğu hakkında fikir vermesi açısından önemli olabilir, ama o aşamada standart dışı olarak nitelendirilir.

Yine 100 mL su örneği çift kuvvette hazırlanmış uygun bir sıvı besiyerine ekilir; inkübasyon sonunda besiyerinde mikroorganizma gelişmemesi hedeflenir. Eğer mikroorganizma gelişimi olmazsa, sonuç "yok/100 mL" olarak verilir. Tersine, besiyerinde gelişme olursa, sadece standardın dışında kaldığı anlaşılır. Sayım yapılmadığı için, standardın ne kadar dışında olduğu anlaşılamaz. Bir diğer deyişle, 100 mL suda 1 adet ya da 1.000 adet bakteri olması arasındaki fark bu şekilde anlaşılamaz. Bu farkın önemli olmadığı gruplar bu test ile analiz edilebilir.

Bazı mikroorganizmaların var/yok analizi birden fazla aşamada yapılır. Örneğin 10 gram gıdada koliform bakteri olması istenmiyor ise, 10 gram gıda 100 mL Brilliant Green Bile Broth besiyerinde inkübe edilir, buradan alınan 1 mL örnek dökme yöntemi ile VRB Agar besiyerine aktarılır. Bu yöntemin ayrıntısı 12.04. Bölümde verilmektedir. Şekil 18'de var/yok testleri şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 18. Var/yok Testleri



Amaca göre 1; 10; 25 g (mL) gıda maddesi amaca göre genel ya da selektif mL besiyeri içinde homojenize edilir. Bu besiyeri analize alınan gıdanın 9 misli hacminde olmalıdır. Erlen, uygun sıcaklıkta inkübe edilir.

İnkübasyon sonunda basit bir bulanıklık ya da renk dönümü ile erlen (+) ya da (-) olarak değerlendirilebilir. Gerekirse muhtemel pozitif erlenden sıvı ve/veya katı besiyerlerine ekim yapılır. Patojen analizinde ardışık birkaç aşama vardır.

Patojen bakterilerin analizinde de bu yöntem uygulanır. *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 serotipinin 25 g (mL) gıdada bulunmasına izin verilmez. Patojenlerin analizinde çeşitli aşamalarda zenginleştirme uygulamaları ve katı besiyeri ekimleri ya da daha pratik ve güvenli olan hızlı test kitleri (Singlepath®) vardır. Sonuç olarak katı besiyerinde yapılan ekim sonunda 1 adet bile hedef mikroorganizma kolonisi olmaması gerekir. Singlepath® sisteminde ise zenginleştirme kültüründe analiz yapılır.

İlgili bölümlerde bu analizler ayrıntılı olarak ve membran filtrasyon bölümünde basit olarak açıklanmıştır.

Var/yok test sonuçlarının verilmesi basit olarak analizi yapılan miktardaki gıdada aranan mikroorganizmanın var ya da yok olduğunun belirtilmesi şeklindedir.

07.09. Biyolojik Stabilité Testi

Özellikle ticari steril olarak tanımlanan gıdalarda önemli bir testtir. Salça, meyve suları ve konsantreleri, reçeller vb. yüksek kuru madde ve/veya yüksek asitlik içeren gıda maddelerinin biyolojik olarak dayanıklılıkları, UHT yöntemi ile işlenmiş içme sütünden farklıdır. Burada örneği verilen tüm gıda maddeleri oda sıcaklığında depolanan ve pazarlanan gıdalardır.

UHT içme sütü, pH'sı, kuru maddesi ve besin içeriği özellikleri nedeni ile mikroorganizma gelişmesine son derece açık bir üründür. Isıl işlemde yetersizlik ve/veya daha sonraki kontaminasyon sonucu bu sütte mikroorganizma bulunursa ürün çok kısa bir süre içinde bozulur. Çünkü, mikroorganizma gelişmesini baskılayan hemen hemen hiçbir engel yoktur.

Oysa salça, meyve suları ve konsantreleri, reçeller vb. ürünlerde herhangi bir şekilde mikroorganizma kalır ise mikroorganizmanın cinsi ve türü, ürünün bozulması üzerinde etkilidir.

Örneğin, salçada bulunan laktik asit bakterisi salçayı bozmakla birlikte, meyve suyu konsantresine bulaşacak laktik asit bakterisi salçadaki kadar önemli değildir. Tersine olarak, salçaya bulaşacak ozmofil maya salça için öncelikli tehdit değil iken, meyve suyu konsantresi için en önemli bozulma etmenleri arasındadır. Sporlu bakterilerin cins ve türü, gıda çeşidi için önemli olabilir.

Salçaya herhangi bir şekilde bulaşan ozmotolerant maya, standart maya küf analizi sırasında belirlenebilir. Benzer şekilde, laktik asit bakterilerinin çoğu meyve suyu konsantresinin toplam bakteri analizi sırasında koloni oluşturabilir.

Ancak, salçada ozmofilik mayanın gelişerek salçayı bozması ve benzer şekilde meyve suyu konsantresinde laktik asit bakterisinin gelişerek meyve suyunda bozulma yapma olasılığı çok düşüktür. Ancak, bu mikroorganizmalar standart analizler sırasında gelişerek koloni oluştururlar, bir diğer deyiş ile varlıklarını gösterirler.

Dolayısıyla ile yüksek asitlik ve/veya kuru madde ile korunan bu gibi gıdalarda biyolojik stabilite testi -ürünün güvenliği açısından- standart analizlere göre daha önemlidir. Kuşkusuz, standart analizlerle ürünün toplam kalitesi hakkında bilgi edinilirse de bu şekilde ürünün güvenliği hakkında yeterince bilgi sahibi olunamaz. Biyolojik stabilite testi basit olarak ürünün normal depolama koşullarında yeterli bir süre incelenmesidir. İlave olarak, ekstrem depolama koşullarında da analiz yapılarak bu koşullar altında da ürünün güvenli olup olmadığı belirlenir. Örneğin, salçada oda sıcaklığında, 28–30 °C'da ve 55 °C'da yapılan 2 haftalık depolama sonunda mikrobiyolojik açıdan bir değişiklik olmaması gerekir.

Bu test işletme şartlarında yapıldığında, ürünün güvenilir olup olmadığını saptamak için pratik uygulamada her zaman yararlı değildir. Örneğin, yine salçada bu test uygulandığında ve ürün "güvenilmez" olarak tanımlandığında o analizin yapıldığı parti zaten büyük olasılıkla bozulmuş olacaktır. Bununla birlikte, inkübasyon sürecinde örnek alınarak sayım yapılması ile bozulma eğilimi saptanabilir.

07.10. Yüzey ve Hava Kontrolü

Çalışma tezgahları, ambalaj materyali ve çalışanların elleri başta olmak üzere çeşitli yüzeylerde hedef mikroorganizmanın (örneğin *E. coli*) bulunmaması ya da belirli bir sınırın altında olması (örneğin toplam bakteri >100 kob/cm²) istenebilir. Bu değerler gıda işletme çeşidine göre önemli ölçüde değişir ve bu kitabın baskıya hazırlandığı Eylül 2005 tarihinde bu konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde kabul edilmiş sınır değerler yoktur. Kuşkusuz, çiğ kıymada çok az dahi olsa *E. coli* 'ye izin verilirken, kıyma olan tezgahta, kasabın elinde ya da bıçağında da *E. coli* çıkması doğal karşılanmalıdır. Ancak, peynirhanede çalışan bir kişinin elinde, tezgahlarda ve peynir teknesi yüzeyinde *E. coli* kesinlikle bulunmamalıdır.

Bu durumda işletmeler kendi iç standartlarını yapmak durumundadır.

Çalışanların ellerinden örnek almak denildiğinde öncelikle akla gelen *E. coli* aranmasıdır. Bu amaçla çok genel olarak, uygun bir *E. coli* katı besiyerine (Fluorocult VRB Agar; Merck 1.04030, Chromocult Coliform Agar ES; Merck 1.00850 vb.) çalışanın sol el parmakları "parmak izi kalacak, ancak besiyeri yırtılmayacak şekilde" değdirilir. İnkübasyon sonunda tipik koloni gelişmesine bağlı olarak değerlendirme yapılır.

Yüzey kontrolleri için yaygın olan uygulama şeklinde ıslatılmış steril swab (sürtme) çubukları belirli bir yüzeye sürülür, sonra bu swab ya katı besiyerine sürülür ya da sıvı (Fluorocult LST Broth; Merck 1.12588) besiyerine aktarılıp, inkübasyon sonunda değerlendirme yapılır. Bu yöntem çok kaba olarak fikir verir.

Yüzeylerde sayım yapılması ya da belirli bir alanda var/yok testi için en uygunu bu amaçla hazırlanmış hafif bombeli kontak Petri kutuları (Envirocheck® Contact Plates) ya da kontak slaytlar (Envirocheck® Contact Slides) kullanılmasıdır.

Envirocheck® Contact Plates 25 cm² yüzeyde analiz yapmak için dizayn edilmiştir. Bulunan sonuçlar 4 ile çarpılarak 100 cm² alanda sayı belirlenir. Kontak slaytlar ise bükülebilir özelliği ve 2 tarafı farklı besiyeri içermesi nedeniyle yaygın kullanım alanı bulmuştur.

Havadan örnek alınması da tartışma konusudur ve bunun da belirli bir standardı yoktur. Sadece 06.01.02. Bölümde verildiği gibi laboratuvarında analiz sırasında açık bırakılan Petri kutusuna 1 kob/dakika mikroorganizma düşmesine izin verilir.

İşletmelerde açık bırakılan Petri kutusu ile havadaki mikroorganizma sayısının belirlenmesi oldukça yaygın bir yöntem olmakla beraber, sadece kabaca bilgi verir. Bu yöntemde mikroorganizma yoğunluğuna göre 1, 5, 10, 30 vb. dakika açık bırakılan Petri kutusunda inkübasyon sonrası sayım yapılır ve sonuç –örneğin 28 kob/9 cm²/10 dakika toplam bakteri şeklinde- verilir. Amaca göre Petri kutusunda bulunan besiyeri toplam bakteri ya da maya küf için hazırlanır.

Mikroorganizmalar havada spor formunda bulunur. Buna göre standart uygulamada koliformlar vb. bakteriler için havadan örnek almaya gerek yoktur.

Bu amaçla; "belirli bir miktar" ya da "belirli bir sürede" örnek alma cihazları da vardır. Basit olarak hava vakum pompası ile çekilirken, açık bırakılmış besiyerine çarpar. Bu cihazlar işletmede standart veri sağlamak için kullanılır.

07.11. Sonuçların Yorumlanması

Mikrobiyolojik analizlerde sonuçların yorumlanmasında belirli kurallar vardır. Aşağıda çeşitli örnekler verilmiştir.

-EMS ile yapılan sayımlarda bütün tüplerin negatif sonuç vermesi ya da kültürel sayımlarda Petri kutusunda koloni görülmemesi durumunda analiz edilen gıdada analizi yapılan mikroorganizmanın olmadığı şeklinde karar verilmez. Bu bulgu sadece analiz edilen miktarda mikroorganizmanın olmadığını gösterir.

-Buna bağılı olarak bu gibi sonuçlar <3 EMS/mL, <100 kob/g şeklinde verilmelidir. Yukarıda ilgili bölümlerde bu konu ayrıntılı olarak verilmiştir.

-Sporlu bakteri sayımı, analiz sonuçlarının yorumlanması oldukça zor olanlardan biridir. Toplam sporlu aerob, toplam sporlu anaerob, *Bacillus cereus* vb. sporlu bakteri analizinde önce materyal pastörize edilerek vejetatif hücreler öldürölür, sonra ekim yapılır. Sayım (ya da var/yok analizinde) elde edilen bulgu her ne olursa olsun, bu bakterilerin gerçek sayısı ya da varlığını/yokluğunu göstermez. Sadece analiz yapıldığı anda spor formunda olan bakterilerin sayısı ya da varlığı/yokluğu konusunda bilgi verir.

-Örneğin, peynirlerde geç şişme etmeni olan *Cl. tyrobutyricum* için çiğ sütteki analiz sonucu <3 EMS/g olarak elde edilirse, bu süttten yapılan peynirde geç şişme olmayacağı şeklinde bir yorum yanlış olacaktır. Çünkü analizin yapıldığı anda söz konusu bakteriler vejetatif formda ve dolayısı ile uygulanan pastörizasyon sırasında ölmüş olabilirler.

-Benzer şekilde genel bir besiyerinden aerobik inkübasyon sonunda elde edilmiş Gram pozitif, çubuk bakterinin *Bacillus* olup olmadığını belirlemek için koloni 1–2 mL su içinde çözölür, pastörize edilir ve yine genel bir besiyerine sürölür. Burada gelişme olursa koloninin sporlu bakteri ve dolayısı ile *Bacillus* olduğuna karar verilir. Ancak gelişme olmazsa bu izolatin sporlu bakteri olmadığına karar vermek yanlış olacaktır. Zayıf bir olasılık olmakla birlikte *Bacillus* türüne ait bakteriler analiz yapıldığı anda tümüyle vejetatif formda olabilir.



**MERCK Havadan Örnek
Alma Cihazı MAS 100**

08. Yıkama

Günlük gıda analizinde kullanılan ilk seyreltme (homojenizasyon) ve diğer seyreltmelerde kullanılan cam malzeme, seyreltme çözeltileri ve pipetler ekimden hemen sonra doğrudan yıkanabilir. Bu işlemde önemli olan nokta, ekim öncesi işlemlerde kullanılan bu malzemenin ne zaman yıkandığıdır. Eğer ekim işleri bitirilip, bu malzeme 2 saat içinde yıkanırsa sorun yoktur. Daha uzun sürede özellikle seyreltme çözeltileri içinde mikroorganizma gelişmesi olacağı için, artık bunlar "mikroorganizma gelişmiş malzeme" olarak değerlendirilir ve otoklavda sterilize edildikten sonra yıkanır.

Patojen bakteri olduğundan endişe edilen ve patojen tehlikesi olmasa bile bozulmuş gıdaların analizinde kullanılan istisnasız tüm malzeme sterilize edilip, daha sonra yıkanmalıdır.

İçinde mikroorganizma gelişmesi olmuş tüm kültürler mikroorganizmanın patojen, saprofit, yararlı olduğuna bakılmaksızın otoklavlandıktan sonra yıkanır.

Yıkama öncesi sterilizasyon, mikrobiyolojik analizlerde en önemli hususlardan birisidir. Bu aşamada uygulanan otoklavlama işlemi standart besiyeri sterilizasyonundan daha yüksektir. Sıcaklık yine 121 °C iken, süre 30 dakika olarak uygulanır. Bunun nedeni, çok yoğun sayıda mikroorganizma olmasıdır.

Otoklav normundaki yükseklik ve daha önemli olarak laboratuvar kuralları çerçevesinde yıkama öncesi sterilize edilecek malzeme ile hazırlanan besiyerlerinin sterilizasyonu aynı otoklavlama işleminde yapılmaz. İdeal olarak bu amaçla 2 ayrı otoklav kullanılmalıdır.

Ancak burada dikkate alınması gereken konu, otoklav eskidiği için yeni bir otoklav alındığında eski otoklavın yıkama öncesi sterilizasyon için ayrılmasıdır. Eski otoklavın bu amaçla kullanıldığı uygulamanın yıkamadan sorumlu personelin sağlığını ciddi bir şekilde riske sokacağı unutulmamalıdır.

Biyokimyasal test uygulanmış tüplerin yıkama öncesi otoklavlanması, kimyasal buharları açısından mümkün olmayabilir. Örneğin, indol testi uygulamasından sonra amil alkol ve HCl buharları sağlığa ve otoklava zarar verir. Bu durumda kimyasal maddeler ile dezenfeksiyon yoluna gidilmelidir. Dezenfektan seçimi ve başta süre olmak üzere uygulama koşulları, kimyasal madde dezenfeksiyonunda dikkate alınmalıdır. İndol testinde kullanılan Kovacs' ayırıcının içindeki amil alkol ve HCl zaten dezenfektan gibi davranıp, mevcut mikroorganizmaları öldürür. Bu testin yapılışından sonra tüplerin oda sıcaklığında 1 gece beklemesi yeterlidir.

Yıkamadan sonra iyi bir durulama son derece önemlidir. Son durulama mutlaka damıtık ya da deiyonize su ile yapılmalıdır. Cam malzemede kalabilecek deterjan kalıntıları mikroorganizma gelişmesini engelleyebilir. Pipetler henüz ıslak iken üzerlerine %0,04 bromtimol mavisi (bromothymol blue; Merck 1.03026) damlatılarak test edilir. Eğer koyu yeşilden açık maviye renk oluşmaz ise deterjan kalmış demektir; tekrar çalkalanıp, test edilmesi gerekir.

Plastik (tek kullanımlık; disposal) malzeme özel otoklav poşetleri içinde sterilize edildikten sonra atılır.

Cam malzemelerde kalan, çözünmesi zor kalıntıları temizlemek için gerekirse yıkama çözeltisi hazırlanabilir. Bu çözelti için 5 g $K_2Cr_2O_7$ (Merck 1.04952) 5 mL saf suda çözülür, üzerine yavaşça 100 mL teknik sülfürik asit katılır. Sıcaklık bu sırada 70–80 °C'a ulaşır. Karışım, oda sıcaklığına soğuduğunda cam kapaklı bir şişeye alınarak saklanır. Bu çözelti ilk hazırlandığında turuncu renktedir. Rengi yeşile döndüğünde artık kullanılamaz, yenisi hazırlanır.



09. Kültür Koleksiyonu ve Otokontrol

Her laboratuvarda günlük analizlerde kullanılan bakterilerin düzenli bir kültür koleksiyonu bulunmalı, bu koleksiyon günlük analizlerde pozitif şahit olarak kullanılmak üzere korunmalıdır. Biyokimyasal testler uygulanıyorsa test sonucunu pozitif ve negatif olarak veren kültürlerin de koleksiyonda bulunması gereklidir. "37. Basit Biyokimyasal Testler" bölümünde testler için pozitif ve negatif şahit bakteri örnekleri verilmiştir.

Örneğin, bir gıda işletmesi laboratuvarında *E. coli* analizi günlük olarak yapılıyorsa bu laboratuvarda *E. coli* kültür koleksiyonuna alınmalıdır.

Koleksiyonun en önemli işlevi, belirli aralıklarla bakterinin analiz yapılan gıdaya ilave edilmesi ve gerek var/yok testlerinde, gerek sayım testlerinde geri alınması ya da ilave edilen miktarın sayım ile doğrulanmasıdır. Bu şekilde laboratuvarda uygulanan yöntemin kontrolü yapılmış olmaktadır.

Geri alma testleri ile sayım testlerinde kullanılacak bakteri sayılarının farklı olacağı açıktır. Örneğin, bir laboratuvarın *Salmonella* analizi açısından yetkinliğinin onaylanması için *Salmonella* / *E. coli* oranı $1:10^6$ olan karışım içinden *Salmonella* geri alınmalıdır. *Salmonella* analizi yapan standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı için *Salmonella* / *E. coli* oranının $1:10^4$ olması yeterlidir.

Buna göre basit olarak, CASO (Tryptic Soy) Broth (Merck 1.05459) gibi standart bir sıvı besiyerinde 10^8 kob/mL gelişme olacağı varsayımı ile; içinde *Salmonella* olmadığı bilinen 25 g (mL) gıda örneğine *E. coli* 'nin CASO Broth kültüründen doğrudan 0,1 mL ve *Salmonella* 'nın CASO Broth kültürünün 10^{-4} seyreltisinden 0,1 mL ilavesi ve bu gıda örneğinin *Salmonella* açısından analizi ile *Salmonella* pozitif sonuç alınması gerekmektedir.

Bu şekilde yapılan bir analizde *Salmonella* pozitif bulgu, bu analizi yapan laboratuvarın rutinde kullanılan *Salmonella* analizi için gerek yöntem gerek personel yetkinliği konusunda tatmin edici olduğunu gösterecektir.

Yukarıda verilen örneğe göre *Salmonella* kültürünün 10^{-5} seyreltisinden 0,1 mL ilavesi ve *Salmonella* 'nın pozitif olarak alınması bir öncekine kıyasla 10 misli daha yetkin ve daha duyarlı analiz yapabilen bir laboratuvarı gösterir.

Burada, CASO Broth kültürlerinin 10^8 kob/mL olduğu varsayılmaktadır. Bu tip çalışmalarda CASO Agar (Merck 1.05458) ya da Plate Count Agar (Merck 1.05463) gibi genel bir besiyerinde çalışılan kültürün mL'sinde kaç adet bakteri olduğu ayrıca belirlenmelidir.

Görüldüğü gibi, bu analizi yapacak laboratuvarın elinde analiz yapılan tüm besiyerleri ve diğer analiz kitleri yanında *Salmonella* ve *E. coli* kültürleri de koleksiyonda bulunmalıdır.

Her ne kadar, kültür koleksiyonu konusunda başta liyofilizasyon (dondurarak kurutma) olmak üzere çok farklı yöntemler bulunmakta ise de, standart analiz yapan bir gıda laboratuvarı için kültür koleksiyonu çok basit kültür koruma yöntemleri ile düzenlenmek durumundadır. Aşağıda çok küçük bir kültür koleksiyonu oluşturmak için yöntem açıklanmaktadır:

-CASO Broth gibi sıvı bir besiyerinde haftalık pasajlarla kültürün canlılığı ve aktivitesi korunsun da, bu yöntem önerilmez. Zaman içinde genetik deformasyon olabilir. Amaç, koleksiyondaki kültürün en az sayıda aktiveleştirilmesidir. Her aktiveleştirmede kültürün kendi özelliklerini yitirme şansı artar.

-Buna göre, kültürün katı besiyeri ortamında korunması zorunludur.

-Genel olarak, yatık CASO Agar besiyerine daldırma ve yüzeye sürme yöntemi gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren pek çok bakteri için geçerli bir yöntemdir. Yatık agar hazırlanması 03.03.04. Bölümde verilmiştir.

-Yatık agar katılaştıktan sonra sıvı kültürden aşı özesi ile yüzeye sürme ve aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır.

-İdeal olarak bu inokülasyonlar en az 2 tüpe yapılır. İnoküle edilen tüpler 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda tüplerin üzerinde gerekli bilgiler (bakteri adı, koleksiyona alındığı tarih, kullanılan besiyeri vb.) yazılı olmak kaydı ile standart buzdolabı sıcaklığında korumaya alınır. Tüplerde kurumamanın önlenmesi için parafilm ile sarılması gereklidir. Daha işlevsel olmak üzere bu besiyeri vida kapaklı tüplerde hazırlanır. Bu amaçla mutfak tipi stretch film de başarılı ve tatmin edici şekilde kullanılmaktadır.

-Koleksiyona alınan bakteri cinsi ile doğrudan ilişkili olmak üzere kullanılan besiyeri çeşidi önemlidir. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren bakterilerin büyük çoğunluğu basit olarak CASO Broth ve CASO Agar besiyerinde gelişmekle birlikte, *Vibrio* için CASO Broth (agar) + NaCl ve *Clostridium* için anaerob ortam gerektiği göz ardı edilmemelidir.

-Örnek alınması gerektiğinde, koleksiyondaki tüpten bir öze kültür alınıp, CASO Broth, Nutrient Broth (Merck 1.05443) gibi uygun bir sıvı besiyerine aktarılır ve uygun sıcaklıkta 24 saat inkübe edilir.

-Tüplerden birisi örnek alınması için kullanılır, diğeri ana stok olarak saklanır. Ana stok, ancak gerekirse kullanılır.

-6 ay sonunda ana stoktan alınacak bir öze kültür uygun bir besiyerinde inkübe edilir, tekrar aynı şekilde koleksiyona alınır.

-Ana stoktaki bakterinin gelişmemesi koşulunda CASO Broth gibi uygun bir steril sıvı besiyerinden 5 mL alınıp, stok yatık agar üzerine ilave edilir, tüp karıştırıcıda kuvvetlice karıştırılır ve tüp uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 24 saat sonunda buradan yine uygun bir sıvı besiyerine inokülasyon yapılır.

Gıda işletmeleri için kültür koleksiyonunda, patojen bakterinin laboratuvardaki varlığına çok dikkat edilmelidir. Buna bağlı olarak koleksiyonun ancak yetkili ve deneyimli personel tarafından düzenlenmesi gereklidir. *Salmonella* kültür koleksiyonuna alınacak ise patojenik olmayan serotipleri ile çalışılması önerilir. *E. coli* O157:H7 serotipi ve diğer primer patojenler gıda işletmelerinde koleksiyona alınmamalı, gerekirse personelin konu üzerindeki eğitimi ve rutin geri alma kontrolleri akademik kurumlarda yapılmalıdır. Pek çok gıda işletme laboratuvarı patojen olmayan bir serotip de olsa hiçbir *Salmonella* ya da diğer herhangi bir patojeni işletme laboratuvarında bulundurmamak istemez.

ISO 11133 sayılı standartta kültür koleksiyonu için 3 kültür olması gerektiği belirtilmektedir:

-Referans Suş: Bir referans kültür koleksiyonundan liyofilize halde ve vakum altında sağlanmış olarak ya da bilinen bir kaynaktan en azından cins ve tür düzeyinde tanımlanmış kültürdür. Referans suşlar referans kültür koleksiyonundan ya da onaylanmış ticari satıcılardan sağlanmış ve orijinal ambalajlarında korunuyor ise, geliştirilmeleri ve kullanımları üretici kuruluşun talimatları doğrultusunda yapılmalıdır.

-Referans Stok: Referans suştan tek alt kültür yapılarak elde edilmiş sıvı besiyeri kültürüdür. Kalite kontrol ve performans testlerinde kullanılmak üzere hazırlanan referans suşların referans stokları çapraz kontaminasyon, mutasyon ya da tipik karakteristiklerinde değişim olasılıklarını en aza indirecek şekilde hazırlanmalı ve korunmalıdır. Referans stokların birden fazla sayıda sıvı kültürü hazırlanmalı ve bunlar derin dondurucuda (-70°C) ya da liyofilize edilerek korunmalıdır. Test organizması olarak kullanılacak olanların gelişme karakteristikleri kapların üzerinde tam olarak belirtilmelidir.

-Çalışma Kültürü: Referans stoktan elde edilen sıvı besiyeri kültürüdür. Liyofilize ya da derin dondurulmuş referans stoklardan hazırlanmalıdır. Sıvılar, referans stoklar arasında çapraz kontaminasyon ya da kültürün nitelik kaybı olmasına izin verilmeyecek şekilde hazırlanmalıdır. Çalışma kültürleri referans stoktan selektif olmayan bir sıvı besiyerine inoküle edilmeli ve durma fazına kadar inkübe edilmelidir. Çalışma kültürlerinden alt kültür yapılmamalıdır. Bununla beraber, çalışma kültürleri uygun depolama koşullarında bir haftadan daha uzun olmamak kaydı ile saklanmak ve çapraz kontaminasyonlara ve nitelik kaybına neden olmayacak şekilde kullanılmasına özen gösterilmek kaydı ile bir kereden fazla olarak da kullanılabilir.

Laboratuvar çalışmalarında otokontrol için çapraz denetlemeler yapılır. Bu denetlemeler günlük analizlerin dışında yapılmalıdır. Temel olarak 3 grup çapraz denetleme vardır:

-Analizlerden sorumlu (A) adlı teknik eleman (X) adlı kendi laboratuvarında aynı partiye ait en az 3 örnekte analiz yapılmalıdır.

-Analizlerden sorumlu (A) adlı teknik eleman (Y) adlı başka bir laboratuvarında aynı partiye ait en az 3 örnekte analiz yapılmalıdır.

-Başka bir laboratuvarın analizlerinden sorumlu (B) adlı teknik eleman (X) adlı laboratuvarında aynı partiye ait en az 3 örnekte analiz yapılmalıdır.

Bu şekilde yapılan çapraz denetleme sonuçları bir arada değerlendirilmeli, kişiler ve/veya laboratuvarlar arasında önemli fark görülüyorsa nedenleri araştırılıp, düzeltici faaliyet uygulanmalıdır.

www.mikrobiyoloji.org

MERCK Orlab kimyaevi.org

Son Güncellenme tarihi 30 Eylül 2005
Toplam Ziyaretçi sayısı 150916.
Sitede Şu An 3 kişi Online.

ANA SAYFA ARAMA LİNKLER ÜYE GİRİŞİ

[Temel Laboratuvar Bilgileri](#)
[Temel Mikrobiyolojik Analizler](#)
[Galeri](#)
[Güvenlik Sertifikaları](#)
[Temel Mikrobiyoloji](#)
[Gıda Mikrobiyolojisi](#)
[Klinik Mikrobiyoloji](#)
[Veteriner Mikrobiyoloji](#)

sözlük

Orlab on-line mikrobiyoloji dergisi

VETERİNER HEKİMLERİ Mikrobiyoloji Dergisi

elimin altında

YENİ

Üyelik Sıkça Sorulan Sorular

Site Hakkında Bize Yazın

Mikrobiyolojinin ABC'si Yayınlar

Merak Ettikleriniz

MERCK Gıda Mikrobiyolojisi

MERCK Mikrobiyoloji Hızlı Erişim

Kısa Kısa Haberler

[I. Ulusal Biyologlar Kurultayı, II. Uluslararası Katılımlı Türkiye'de Biyologların ve Biyoloji Eğitiminin Sorunları Kongresi 29 Ekim- 2 Kasım 2005 ANTALYA](#)
info@biyologlardernegi.org.tr

10. Stok Takibi ve Analiz Ekonomisi

Tüm laboratuvar analizlerinde olduğu gibi gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında da analiz maliyetleri önemlidir. Toplam analiz giderini azaltmak için analiz sayısında azaltma yapmak, ucuz malzeme kullanmak vb. gibi gereksiz ve kimi zaman çok daha pahalıya gelebilecek önlemler alma yoluna gidilmemelidir. Fiyatı düşük ile ucuz olanın arasındaki karşılaştırma 01. Bölümün sonunda (sayfa 10) gösterilmiştir.

Aşağıda laboratuvar analiz maliyetini azaltmak için basit bazı örnekler verilmiştir:

-Ekimlerde gereksiz yüksek ya da düşük seyreltmelerden kaçınılması gerekir. Bu konu 06.01.01. Bölümde açıklanmıştır.

-Besiyeri kutusu fiyatı kadar, o kutudan kaç litre besiyeri elde edildiği, dolayısıyla kaç analiz yapıldığı da önemlidir. Örneğin, her ikisi de *E. coli* analizinde kullanılan Fluorocult LST Broth ile Fluorocult LMX Broth besiyerlerinin maliyet karşılaştırması aşağıda verilmiştir. Bu iki besiyeri, kutu fiyatı üzerinden kıyaslandığında 2,69 olan oran, litre fiyatları kıyaslandığında sadece 1,25 olmaktadır. LMX Broth ile yapılan analizin maliyeti LST Broth ile yapıldığına göre daha yüksektir ancak, kıyaslama doğrudan 1 litre besiyerinin maliyeti üzerinden yapılmalıdır; kutu fiyatı önemli değildir. Benzer durum farklı markalardaki besiyeri katkıları için de geçerlidir.

Çizelge 09. Ekonomik Kıyas

	LMX Broth	Fluorocult LST Broth	LMX/LST
500 g kutu fiyatı*	292,13 €	108,67 €	2,69
Hazırlanma şekli	17 g/Litre	36,5 g/Litre	0,46
1 Litre maliyeti	9,93 €/Litre	7,93 €/Litre	1,25

* Kaynak: Orkim Ltd, 2005 fiyat listesi.

-Besiyeri katkıları çoğu zaman belirli bir hacim bazal besiyerine ilave edilmek üzere hazırlanmıştır. Bu katkılar oldukça ekonomik bir şekilde kullanılabilir. Örneğin, *Listeria* analizinde kullanılan Fraser Broth besiyeri 1/2 ve 1/1 konsantrasyonda kullanılır. 4 örneğin beraberce analizi yapılması halinde 1 kutu katkı tümüyle kullanılır. Bu konuda *Listeria* analizi bölümünde (20.01.) açıklama vardır.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında kullanılan çoğu besiyeri sipariştten kısa bir süre sağlanabilmekle beraber, laboratuvar stoklarının düzenli tutulması zorunludur.

Stok takibinde besiyerinin hazırlanma şekli ve günlük kullanım miktarı dikkate alınır. Aşağıda bu konuda çeşitli örnekler verilmiştir.

-Örnek 1: Haftada bir kez olmak üzere 2 farklı üründen ve sadece 10^{-1} seyreltiden Plate Count Agar besiyerine 2 paralel ekim yapılmaktadır. PCA besiyeri 22,5 g/L konsantrasyonda hazırlandığına göre 1 kutu besiyeri ile 1777 adet Petri kutusu hazırlanır. Haftada 4 Petri kutusu kullanıldığına göre 500 gram olan 1 kutu besiyeri 444 hafta (yaklaşık 8,5 yıl) yeterlidir. Laboratuvarda herhangi bir besiyerinin bu kadar uzun süre depolanamayacağı açıktır. Bu örnekte, işletmenin besiyerini satın almaması, bunun yerine bir başka laboratuvardan küçük partiler halinde sağlaması çok daha ekonomik olacaktır.

-Örnek 2: Kanlı agar besiyeri hazırlanması için kuralına uygun olarak alınmış defibrine kan gereklidir. Bunun sağlanması kolay değildir ve kan alınması uzmanlık gerektirir. Bu nedenle kanlı agar besiyerinin dış laboratuvarlardan satın alınması, laboratuvarda hazırlamaktan çok daha kolay ve ucuzdur.

-Örnek 3: Her gün 5 adet 100 mL MRS Broth kullanılıyorsa durum yukarıdaki örnekten çok farklıdır. MRS Broth 52,2 g/L konsantrasyonda hazırlandığına göre 1 kutu dehidre besiyeri ile 9,57 litre MRS Broth hazırlanır. Bu durumda 500 gram olan 1 kutu MRS Broth sadece 19 gün için yeterlidir. Genel olarak 45 gün ithalat süresi de dikkate alınırsa işletme laboratuvarında 3 kutu besiyeri her zaman stokta bulunmalı, kullanımda olan üçüncü kutu bittiği anda yenisi sipariş verilmelidir.

Kullanılacak besiyerinin ve analiz yönteminin seçiminde de analiz ekonomisine dikkat edilmelidir. Bunun en tipik örneği koliform grup bakterilerin analizidir.

Örneğin, bir su analizinde hedef sadece 100 mL'de koliform grup bakteri olmaması ise, bu kontrol farklı şekillerde yapılabilir:

-100 mL su örneği membran filtreden geçirilip, filtre VRB Agar besiyerinde inkübe edilir. İnkübasyon sonunda filtre üzerinde tipik koliform grup bakteri kolonisi olmamalıdır. Olursa, bunun sayısı ve hangi tür(ler)e ait olduğu önemli değildir, analiz bitmiştir.

- İçinde Durham tüpü olan büyük tüplere (70–80 mL'lik), çift kuvvette, 4 adet 25 mL LST Broth hazırlanır, bunlara 100 mL su örneği 25'er mL olarak dağıtılır (daha büyük ya da daha küçük tüplerde de aynı yaklaşım ile analiz yapılabilir). İnkübasyon sonrasında bu tüplerin birisinde bile gaz görülürse analiz edilen örnekte koliform olduğuna karar verilir. Yine, bakteri sayısı ve türü önemsizdir.

-Bu çalışma Durham tüpü kullanmamak üzere LMX Broth ile de yapılabilir.

-Su örneğine ReadyCult Coliforms ilave edilir, inkübasyon sonunda renk mavi–yeşil olursa "suda koliform grup bakteri vardır" şeklinde karar verilir (bakınız; 12.03. Bölüm).

Bu 4 yöntemin analiz maliyetlerinde besiyeri payı sırası ile; 0,0653 €; 0,4846 €; 1,9865 € ve 2,1705 € olmaktadır.

İlk yöntemde (membran filtrasyon) seti olmalıdır, bunun sterilizasyonu gerekir. Sterilizasyon alkol ile yapılıyorsa maliyet oluşturur. Ancak burada asıl bağlayıcı olan, membran filtrasyon setinin varlığıdır. Diğer maliyetler ihmal edilebilir.

İkinci yöntem (LST Broth), membran filtrasyon sisteminin olmaması halinde, analiz maliyeti açısından makul olarak değerlendirilebilir.

Üçüncü ve dördüncü analizlerde kullanılan besiyerlerinde, *E. coli* tanımlamaya yönelik MUG katkısı vardır. Eğer, analiz sadece koliform grup bakterinin olmaması hedeflenerek yapılıyor ve 1 adet bile koliform grup bakteri varsa o ürün reddediliyor ise, MUG katkısı için gereksiz yere ücret ödenmiş olacaktır. Tersine olarak, koliform grup varsa ve bunun *E. coli* olup olmadığının belirlenmesi de işletme için bir değer ifade ediyorsa, bu besiyerlerini kullanmak anlamlı olacaktır.

Üçüncü yöntemde Durham tüpü kullanmaya gerek yoktur. Son yöntemde ise, besiyeri hazırlama aşaması bile yoktur, steril bir erlene alınan su örneği üzerine 1 poşet hazır besiyeri ilave edilir.

Görüldüğü gibi, analiz maliyeti sadece besiyeri gideri üzerinden yapılırsa membran filtrasyon + VRB Agar yöntemi en düşük maliyeti oluştururken, koşullara göre ReadyCult Coliforms yöntemi de seçilebilir.

Bir başka örnek, membran filtrasyon sisteminde kullanılmak üzere besiyeri hazırlamaktır. Standart boydaki membran filtreler için 6 cm çapında Petri kutuları kullanılırsa daha az besiyeri harcanmış olur. Ancak, bu uygulama çok sık kullanılmıyor ise 6 cm çaplı Petri kutusu almak, gereksiz laboratuvar gideri olarak ele alınmalıdır.

Özellikle *Staph. aureus* analizlerinde yayma yöntemi ile yapılan sayımda, 14 cm çaplı Petri kutularına 1 mL yayma ya da standart boyda 3 Petri kutusuna 1 mL dağıtma yaygın bir uygulamadır. Standart boy Petri kutularına 12,5 mL besiyeri dökülürken, 14 cm Petri kutusu için bu miktar 50 mL'dir. Konuya sadece besiyeri gideri açısından bakıldığında, 3 adet standart Petri kutusu kullanmak çok daha mantıklıdır. Ancak, 3 Petri kutusunun ayrı ayrı yazılması, bunların tek Petri kutusu gibi değerlendirilmesi gibi işlemler dikkate alındığında, kullanım kolaylığı açısından 14 cm çaplı Petri kutusu çok daha elverişlidir.

Buna göre sadece besiyeri gideri değil, koşullar ve amaç da dikkate alınarak besiyeri ve yöntem seçime karar verilmelidir.

MERCK Singlepath; Hızlı, Güvenli, Duyarlı

Singlepath® Salmonella		
Singlepath® Salmonella	1.04140	25 test
Peptone Water; Buffered (TPS)	1.07228	500 g
Salmonella Enrichment Broth acc. to Rappaport-Vassiliadis (RVS Broth)	1.07700	500 g
Singlepath® Listeria		
Singlepath® Listeria	1.04140	25 test
FRASER Listeria Selective Enrichment Broth (base)	1.10398	500 g
FRASER Listeria Supplement	1.10399	16 vial
Listeria Enrichment Broth, Buffered (base) acc. to FDA/BAM 1995 (bLEB)	1.09628	500 g
Listeria Selective Enrichment Supplement acc. to FDA/BAM 1995	1.11781	16 vial
UVM-Listeria Selective Enrichment Broth Modified	1.10824	500 g
UVM-II Supplement	1.04039	1 vial
Singlepath® Campylobacter		
Singlepath® Campylobacter	1.04143	25 test
Bolton Broth	1.00068	500 g
Bolton Broth Selective Supplement	1.00069	16 vial
Anaerocult C	1.16275	1 x 25
Singlepath® E. coli O157		
Singlepath® E. coli O157	1.04141	25 test
mEC Broth	1.14582	500 g
mTSB Broth	1.09205	500 g
Duopath® Verotoxins		
Duopath® Verotoxins	1.04144	25 test
mEC Selective Enrichment Broth w/Novobiocin	1.14582	500 g
mTSB Selective Enrichment Broth w/Novobiocin	1.09205	500 g
CAYE Broth mod. acc. to Evans	1.00060	500 g
CAYE Broth Supplement (Carbadox)	1.00051	16 vial
Bacillus cereus Selective Supplement (Polymycin B-sulfate)	1.09875	16 vial
SMAC agar	1.09207	500 g
CT-Supplement	1.09202	16 vial

11. Toplam Bakteri Sayımı

11.01. Katı Besiyerinde Toplam Mezofil Aerob Bakteri Sayımı	135
11.02. Toplam Psikrofil Bakteri Sayımı	136
11.03. Toplam Termofil Bakteri Sayımı	137
11.04. Toplam Sporlu Bakteri Sayımı	138
11.05. Toplam Anaerob Bakteri Sayımı	139
11.06. Toplam Halofil Bakteri Sayımı	140
11.07. İnkübasyon Sonrası Psikrofil Bakteri Sayımı	140
11.08. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz	140

Toplam bakteri (jerm) sayımı -genel olarak- hijyen kontrolü amacıyla yapılır. Toplam bakteri ile "toplam mezofil aerob bakteri" kastedilir. Toplam psikrofiller, toplam termofiller ve diğer gruplarda da sayım aynı esas ile yapılır.

11.01. Katı Besiyerinde Toplam Mezofil Aerob Bakteri Sayımı

Çoğu kez Plate Count Agar olmak üzere genel bir besiyerinde standart yayma ya da dökme yöntemiyle ekim ve inkübasyondan sonra bu besiyerinde oluşan koloniler sayılarak bakteri sayısı belirlenir. Plate Count Agar besiyeri, ISO 4833 ve FDA Form 2400a 3/01 ve daha pek çok uluslararası standarda uygun olarak toplam bakteri analizinde kullanılmaktadır. Yöntem şematik olarak, Ek A 01'de verilmiştir.

Not 1: Günlük ve standart uygulamada inkübasyon sıcaklığı 28 °C ve süre 48 saattir. Bu şekilde genel hijyen ya da işletme sanitasyonu kontrol edilir. Avrupa ülkelerinde yaygın olarak 30–32 °C benimsenir. İnkübasyon sıcaklığı ABD'nde 35–37 °C ve inkübasyon süresi 24–48 saat olarak benimsenmektedir ve bu şekilde gıdanın potansiyel tehlikesi belirlenir. Bu nedenle inkübasyon parametreleri rapora yazılmalıdır. Benzer uygulama koliform grup bakteri analizinde de vardır.

Not 2: Süt ürünlerinde toplam bakteri analizinde Plate Count Skim Milk Agar besiyeri kullanılması IDF (Uluslararası Sütçülük Federasyonu; International Dairy Federation) tarafından önerilmektedir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
Plate Count Agar (Merck 1.05463)
Plate Count Skim Milk Agar (Merck 1.15338)
Su Agar

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-Eğer analiz edilen örnekte Petri kutusunun yüzeyini kaplayacak şekilde yayılma yapan bakteriler olduğundan kuşkulaniyor ise ekimden sonra Plate Count Agar üzerine 45 °C'da tutulan 4–5 mL Su Agar besiyeri dökülür ve bu uygulama analiz raporunda belirtilir.

-Seçilen inkübasyon sıcaklığında 48±2 saat inkübasyon sonunda PCA besiyerinde gelişen bütün koloniler "toplam bakteri" olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir. Su analizlerinde inkübasyon 22 °C'da 72 saat ve ayrıca 37 °C'da 48 saat olarak yapılmaktadır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

11.02. Toplam Psikrofil Bakteri Sayımı

Düşük sıcaklık derecelerinde gelişen psikrofil ve psikrotrof bakterilerin sayımı ISO 17410'a göre yapılır. Günlük ve standart uygulamada inkübasyon sıcaklığı 6,5 °C ve süre 10 gündür. 4,5 °C'da 14 günlük inkübasyon da uygulanmaktadır. Bu nedenle inkübasyon parametreleri ilgili talimatlara ve analiz raporuna yazılmalıdır.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Plate Count Agar (Merck 1.05463)

Plate Count Skim Milk Agar (Merck 1.15338)

Not: Süt ürünlerinde toplam bakteri analizinde Plate Count Skim Milk Agar besiyeri kullanılması IDF ve ISO (17410) tarafından önerilmektedir. Ayrıca; inkübasyon sıcaklığı kritiktir. Maksimum–minimum termometre ile kontrol edilmelidir.

Analiz

- Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.
- Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.
- Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.
- İnkübasyon sonunda (6,5 °C'da 10 gün) Plate Count Agar besiyerinde gelişen tüm koloniler toplam psikrofil bakteri olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.
- Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

11.03. Toplam Termofil Bakteri Sayımı

Termofil ve termotrof (termodurik) bakterilerin sayımı için günlük ve standart uygulamada inkübasyon sıcaklığı 45 °C ve süre 48–72 saattir. İnkübasyon sıcaklığı 55 °C ve inkübasyon süresi 48–72 saat olarak seçilebilir. İnkübasyon parametreleri ilgili talimata ve analiz raporuna yazılmalıdır.

Not 1: Yüksek sıcaklıkta inkübasyonda besiyeri kuruyabilir. Bunun önüne geçmek için Petri kutuları mutfak tipi stretch film ile sarılarak inkübe edilmelidir.

Not 2: IDF'ye göre süt ürünlerinde toplam bakteri analizinde Plate Count Skim Milk Agar besiyeri kullanılmalıdır

Not 3: İnkübasyon sıcaklığı kritiktir. Maksimum–minimum termometre ile kontrol edilmelidir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
Plate Count Agar (Merck 1.05463)
Plate Count Skim Milk Agar (Merck 1.15338)

Analiz

- Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.
- Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.
- Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.
- İnkübasyon sonunda (45 °C'da 48–72 saat) Plate Count Agar besiyerinde gelişen tüm koloniler toplam termofil bakteri olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.
- Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

11.04. Toplam Sporlu Bakteri Sayımı

Gıda örneğinde sporlu bakterilerin sayısını belirlemek için, gıda örneği önce pastörize edilerek vejetatif hücreler öldürülür, sonra analize standart yöntemle devam edilir. Ekimden sonra uygun gelişme koşulları ile karşılaşılan sporlar, vejetatif hücre haline döner ve gelişerek koloni yapar. Toplam sporlu bakteri ile kasıt toplam mezofilik aerobik sporlu bakterilerdir ve *Bacillus* türleri ifade edilir.

Her ne kadar bu uygulamanın adı "toplam sporlu bakteri sayımı" ise de, gerçekte sayılan tüm spor oluşturabilen bakteriler değil, analiz anında spor formunda olanlardır. Ortam koşulları uygun ise bakteri spor oluşturmaz, vejetatif formda kalarak çoğalma eğilimi gösterir. Dolayısı ile, elde edilen sonuç, spor oluşturma yeteneğindeki bakteri sayısının çok altında olabilir (bakınız; 07.11. Bölüm).

Not 1: Sporlu bakteri sayımında genel olarak 80 °C'da 5 dakikalık pastörizasyon uygulanır. Bu ısı işlem için literatürde 70 °C'da 20 dakika, 80–85 °C'da 1–5 dakika, 80±1 °C'da 12 dakika gibi farklı önerilere rastlanılmaktadır. Taze peynirde hasar görmüş *Cl. tyrobutyricum* analizinde 62,5 °C'da 30 dakikalık uygulamalara da rastlanılmaktadır.

Not 2: Test ve kontrol tüplerinin et kalınlıkları, çapları, boyları aynı olmalı, içlerinde aynı miktarda örnek bulunmalıdır.

Not 3: IDF'ye göre süt ürünlerinde toplam bakteri analizinde Plate Count Skim Milk Agar besiyeri kullanılmalıdır.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözültisi (Merck 1.15525)
Plate Count Agar (Merck 1.05463)
Plate Count Skim Milk Agar (Merck 1.15338)

Analiz

- Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.
- Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.
- Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.
- Tüp içindeki örnek, kaynar su banyosuna daldırılır, aynı çeper kalınlığındaki tüpte bulunan bir diğer örneğe termometre yerleştirilir.
- Kontrol tüpündeki sıcaklık 80 °C'a eriştiğinde her iki tüp su banyosundan çıkarılır, kontrol tüpünün sıcaklığı kontrol edilerek sıcaklık 79 °C'a düştüğünde tekrar kaynar su banyosuna beraberce daldırılırlar. Bu şekilde 5 dakika tutulduktan sonra test tüpü oda sıcaklığındaki su banyosuna alınır ve soğutulur. Pek çok uluslararası standartta soğutmanın buz banyosu içinde ve hızla yapılması gerektiğine dikkat çekilir. Soğutma şekli ilgili talimatta yazılmalıdır.
- Gerekli ise seyreltmeler bu aşamada (pastörizasyondan sonra) yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.
- İnkübasyon sonunda (28 °C'da 48 saat) Plate Count Agar besiyerinde gelişen tüm koloniler toplam sporlu bakteri olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.
- Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

11.05. Toplam Anaerob Bakteri Sayımı

Toplam anaerob bakteri ile "anaerob mezofil bakteri" kastedilir. 21. *Clostridium perfringens* ve 30. Anaeroblar bölümlerinde konu ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir. Oksijensiz ortamda yapılan inkübasyon sonunda katı bir besiyerinde gelişen koloniler sayılır ya da EMS yönteminde tüpler değerlendirilir.

11.06. Toplam Halofil Bakteri Sayımı

Halofil karakterli olan ve gelişmeleri için mutlak olarak tuza gereksinim duyan bakteriler ile halotolerantların sayımında Plate Count Agar (Merck 1.05463) besiyerine amaca uygun olarak %2–8 NaCl (Merck 1.06404) eklenir ve standart yöntemle sayım yapılır.

11.07. İnkübasyon Sonrası Psikrofil Bakteri Sayımı

Standart mikrobiyolojik sayımlarda inkübasyon sonrası sayım yoktur. İnkübasyon sonrası ekim sadece var/yok testlerinin bir bölümüdür. Bununla beraber, ısıl işlem görmüş sütlerde psikrofil/psikrotrof bakteri sayımı bu yöntemle yapılır. Bir anlamda amaç, pastörize sütün normal raf ömrü içinde psikrofil bakteri sayısındaki artışı belirlemektir. Bunun için süt örneği önce 6 °C'da 5 gün süre ile inkübe edilir, sonra standart yöntemle Plate Count Skim Milk Agar (Merck 1.15338) besiyerine ekim yapılır. Petri kutuları 21 °C'da 24 saat inkübe edilir. Plate Count Skim Milk Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı tüm koloniler toplam psikrofil bakteri olarak sayılır, bakteri sayısı hesaplanır ve standart kurallara göre sonuç verilir.

11.08. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz

Gıdalarda ve özellikle su örneklerinde toplam bakteri sayısı membran filtrasyon yöntemiyle belirlenebilir. "07.03. Membran Filtrasyon" ve "12.05. Koliform Bakterilerin Membran Filtrasyon Yöntemiyle Sayılması" bölümlerinde, yöntem ana hatları ile açıklanmıştır.

Kullanılan besiyeri Plate Count Agar (Merck 1.05463)'dır. İnkübasyon sıcaklığı amaca göre seçilir ve analiz raporunda belirtilir.

Not: Membran filtrasyon üreticisi firmalar tarafından ped üzerine emdirilerek hazırlanmış besiyerleri üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılır.

12. Koliform Grup Bakteriler

12.01. Katı Besiyerinde Sayım	142
12.02. EMS Yöntemi ile Sayım	144
12.03. Sular da Var/yok Testi	145
12.04. Gıdalarda Var/yok Testi	146
12.05. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz	147
12.06. Yüzey Kontrolü	149

Koliform grup bakteriler denildiğinde; 37 °C'da 48 saat içinde laktozdan asit ve gaz oluşturan, Gram negatif, sporsuz, çubuk şeklinde olan bakteriler anlaşılır. Bu tarife göre; Enterobacteriaceae familyası üyeleri olan *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Ent. cloacae*, *Citrobacter freundii* ve *Klebsiella pneumoniae* koliform grup bakteriler olarak tanımlanmış olur. Fekal koliformlar ayrı bir gruptur.

Koliform grup bakteriler gıdalarda hijyen indikatörü olarak değerlendirilir. Grup üyeleri içinde primer patojen *E. coli* O157:H7 serotipi ile fırsatçı patojenler de bulunmaktadır. Bu nedenle gıdalarda koliform grup bakteri sayısının yüksek olması istenmez. Bazı gıdalarda belirli bir miktar örnekte "yok" olması hedef alınırken, pastörize içme sütü dahil pek çok gıdada bitki ve toprak kökenli koliformların belirli sayılarda bulunmasına izin verilmektedir. Buna göre analizinde sayım ya da var/yok testleri uygulanır.

Gıda sanayisinde yoğun tartışmalara neden olan konu; "*Klebsiella pneumoniae* gibi fırsatçı patojenlere gıda örneğinde rastlandığında sağlık açısından nasıl bir yargıya varılacağıdır". Bir bakış açısına göre bu bakterinin rastlandığı gıda -bakteri sayısına bakılmaksızın- insan sağlığı açısından tehlikeli olarak yorumlanır. Tersine olarak, uluslararası standartlarda gıdalarda koliform bakterilerin EMS yöntemi ile analizi gösterilir ve çoğu gıda için 9 EMS/g (mL) sayıya kadar izin verilir. Bu durumda bir katı besiyerinde ya da EMS yöntemiyle yapılan sayımda tür tanımlamasına gitmek gerekli değildir. Bu bakış açısına göre patojen olarak değerlendirilse bile *Kleb. pneumoniae* varlığına 9 kob/g (mL) düzeyde izin verilmektedir.

Bu grup üyeleri arasında bitki ve toprak kökenli olanlar bulunduğu gibi, fekal koliformlar olarak tanımlanan ve doğada sadece sıcak kanlı hayvanların (memeliler ve kanatlılar) bağırsak sistemlerinde bulunanlar da vardır. Fekal koliformlar (bakınız; 13. Bölüm) ve bunların en tipik üyesi *E. coli* analizi (bakınız; 14. Bölüm) standart koliform analizinden farklıdır. Yine koliform grup üyesi olan *E. coli* O157:H7 serotipi analizi (bakınız; 15. Bölüm) ise çok daha farklıdır. Bu bölümde sadece genel hijyen indeksi olarak aranan/sayılan koliform grup bakterilerin analiz yöntemleri verilmiştir. Fekal koliformlar, *E. coli* ve *E. coli* O157:H7 serotipi bu analizlerin bir kısmında "standart koliform grup bakteri" olarak sonuç verir.

Not 1: Koliform grup bakterilerin analizinde inkübasyon sıcaklığı olarak yaygın bir şekilde 35–37 °C kullanılmakla beraber, uluslararası kuruluşlar tarafından 30 °C (ISO 4831) ve 32 °C (FDA Form 2400a 3/01) inkübasyon sıcaklığı önerilmektedir. Bunlardan 30–32 °C genel olarak proses kontrolü, 35–37 °C ise ürünün potansiyel sağlık riski taşıyıp taşımadığının belirlenmesi amacıyla seçilir. Benzer uygulama toplam mezofil aerob bakteri sayımında da vardır (bakınız; 11.01. Bölüm). İlgili talimatta ve analiz raporunda inkübasyon sıcaklığının belirtilmesi kaydı ile bu sıcaklık derecelerinden herhangi birisi uygulanabilir.

Not 2: Koliform grup bakteriler ve fekal koliformların analizinde kullanılan Violet Red Bile (VRB) Agar, son zamanlarda VRBL (Violet Red Bile Lactose) Agar olarak anılmaktadır. Bu uygulamadaki amaç, Enterobacteriaceae sayımında kullanılan Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar ile karışıklık olmaması içindir.

Not 3: Koliform grup bakteri analizlerinin bazılarında bu grubun laktozdan asit oluşturma özelliği esas alınır. Örneğin, koliform bakterilerin laktozdan asit oluşturma sonucunda VRB Agar bileşimindeki pH indikatörü, kolonilerin koyu kırmızı renk oluşturmaya neden olur. Bazı gıdalarda -başta glikoz olmak üzere- laktozdan başka şekerler de vardır. Özellikle sıvı ve 1 mL ekim yapılan bu gıdalarda koliform grup olmayan bazı bakteriler laktoz dışındaki şekerlerden asit oluşturarak sahte pozitif sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle atipik görünümde olan koloniler ayrı ayrı Brilliant Green Bile (BGB) Broth'a ekilerek, burada 30–32 °C'da 24 saat içinde gaz oluşumu kontrol edilmelidir. Bu kontrol, yöntemin doğruluğunu onaylamak için 3'er ay aralıklarla tipik kolonilere de uygulanmalıdır.

Not 4: Koliform grup bakteri analizlerinin bazılarında bu grubun laktozdan gaz oluşturma özelliği esas alınır. Buna göre, Lauryl Sulfate (LST) Broth ve BGB Broth besiyeri tüplerindeki Durham tüplerinde biriken gaz, koliform grup bakteriler için tipik reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu besiyerlerinde, Enterobacteriaceae familyası üyeleri başta olmak üzere, koliform grup dışında bazı bakteriler de gaz oluşturmada gelişebilir. Bu nedenle koliformlar için tipik reaksiyon; gelişmeye bağlı bulanıklık ve Durham tüpünde gaz görülmesidir.

12.01. Katı Besiyerinde Sayım

Koliform grup bakterilerin katı besiyerinde sayımı için pek çok agarlı besiyeri bulunmakla birlikte, günlük uygulamada yaygın olarak VRB Agar (ISO 4832, FDA Form 2400a; 3/01), Chromocult Coliform Agar ve Chromocult Coliform Agar ES besiyerleri kullanılmaktadır.

ISO 4832 sayılı standart Türk Standartları Enstitüsü'nden "TS 7569 ISO 4832, Mikrobiyoloji- Koliform Grubu Bakteri Sayımı İçin Genel Kurallar- Koloni Sayım Tekniği" adı ile Türkçe kaynak olarak sağlanabilir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltilisi (Merck 1.15525)

VRB Agar (Merck 1.01406)

Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454)

Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)

Chromocult Coliform Agar (Enhanced Selectivity) ES (Merck 1.00850)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-Dökme yönteminde tam jelleşmeden sonra, yayma yönteminde ise besiyerinin sıvıyı emmesinden sonra 45–50 °C'da tutulan 4–5 mL kadar erimiş VRB Agar besiyeri ikinci kat olarak dökülür. İkinci katın da tam olarak jelleşmesinden sonra Petri kutuları kapakları üzerine çevrilerek, inkübatöre yerleştirilir. İnkübasyon sıcaklığı, ilgili talimatta ve analiz raporunda belirtilmelidir.

-Seçilen inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat inkübasyon sonunda VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak sayılır (bakınız; Ek A 02 ve Ek B 01).

-VRB Agar'da atipik koloni gelişimi olursa bunlar BGB Broth besiyerine aşılanır ve 30–32 °C'da 24 saat sonra gaz oluşumu izlenir (bakınız; Ek B 02).

-*E. coli* dışındaki koliformlar; Chromocult Coliform Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı pembe–kırmızı renkli koloni (bakınız; Ek B 03), Chromocult Coliform Agar ES besiyerinde ise 1–2 mm çaplı somon–kırmızı renkli koloni oluşturur (bakınız; Ek B 04). Bu uygulamada, her iki besiyerinde de koyu mavi–menekşe renkli *E. coli* kolonilerinin sayısının da koliform grup bakteri sayısına eklenmesi gerekir. *E. coli* varlığı saptanırsa ayrı olarak rapora geçilmesi önerilir.

-Koliform grup sayısı standart şekilde hesaplanır ve kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

12.02. EMS Yöntemi ile Sayım

Koliform grup bakteriler için selektif olan Lauryl Sulfate (LST) Broth besiyerinde inkübasyondan sonra gelişmeye bağlı bulanıklık ve gaz oluşumu görülen tüpler "muhtemel koliform pozitif" olarak değerlendirilir ve bunlardan "doğrulama amacıyla" BGB Broth besiyerine ekim yapılır. BGB Broth'ta inkübasyondan sonra gelişmeye bağlı bulanıklık ve gaz oluşumu görülen tüpler ise "doğrulanmış koliform pozitif" olarak değerlendirilip, EMS çizelgesinden koliform sayısı EMS olarak hesaplanır. Günlük uygulamada LST Broth'ta bulanıklık ve gaz görülmesi "koliform pozitif" olarak kabul edilir, BGB Broth doğrulamasına gerek duyulmaz.

Koliform grup bakterilerin EMS yöntemiyle sayımı için pek çok sıvı besiyeri bulunmakla beraber, günlük uygulamada yaygın olarak LST Broth ve BGB Broth (ISO 4831) besiyerleri kullanılmaktadır.

ISO 4831 sayılı standart, Türk Standartları Enstitüsü'nden "TS 7725 ISO 4831; Mikrobiyoloji- Koliform Grubu Bakterilerinin Sayımı İçin Genel Kurallar- En Muhtemel Sayı Tekniği" adı ile Türkçe kaynak olarak sağlanabilir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltilisi (Merck 1.15525)
LST Broth (Merck 1.10266)
Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız. Yöntem şematik olarak Ek A 03'te verilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak LST Broth tüplerine ekim yapılır. Gerekliyse LST Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-Seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 24 ± 2 saat inkübe edilir. Bazı standartlarda üreme (gaz) görülmemesi halinde ilave 24 ± 2 saat daha inkübasyon önerilmektedir.

-İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve gaz görülen tüpler, "koliform grup pozitif" olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak koliform grup sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Bazı standartlarda LST pozitif tüplerden, BGB Broth'a inokülasyon ve burada da 30 °C'da 24 saat sonunda gaz oluşumunun incelenmesi önerilir (bakınız; Ek B 02).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

12.03. Sulara Var/yok Testi

Günlük uygulamada içme, kullanma ya da işletme suyu gibi koliform grup bakteri "olmaması" gereken örnekler için kullanılır. Bu bölümde, 100 mL su örneğinde koliform grup bakteri olup olmadığının kontrolü verilmiştir.

Kullanılan Malzeme

ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Su örneği mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir, steril uygun bir kaba (erlen, şişe vb.) 100 mL olarak aktarılır.

-Önceden ısıtılarak sterilize edilmiş besiyerinin ambalajı aseptik koşullara uyularak açılır, dehidre besiyerinin tümü su örneğine aktarılır, tüm partiküller eriyinceye kadar elle ve yavaşça karıştırılır.

-İnkübasyon sonrasında (37 °C'da 24±2 saat) besiyeri renginin mavi–yeşile dönüşmesi, analiz edilen suda koliform bakteri varlığını gösterir ve "100 mL suda koliform bakteri var" şeklinde sonuç verilir. Besiyeri rengi değişmezse "100 mL suda koliform grup bakteri olmadığı" anlaşılr. İnkübasyon sonunda orijinal sarı renk korunuyor -ancak bulanıklık varsa (bakınız; Ek A 04)- koliform grup bakteriler dışında bakteriyel gelişmeye karar verilir ve analiz sonucu yine "100 mL suda koliform grup bakteri yok" şeklinde düzenlenir.

-Koliform pozitif çıkan örnekte *E. coli* analizi yapılabilir (bakınız; 14.04. Bölüm).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

12.04. Gıdalarda Var/yok Testi

Pek çok gıdanın belirli bir miktarında koliform grup bakteri bulunmaması hedef alınır. Bu amaçla var/yok testi yapılır.

Bu bölümde 10 g (mL) gıda örneğinde koliform grubu bakterilerin var/yok testi ile analizi verilmiştir. 1, 5, 25 g (mL) vb. gibi miktarların analizinde sadece miktar ile orantılı olarak kullanılan besiyeri hacmi değişir. Genel olarak, analiz edilen gıdanın 9 misli sıvı besiyeri kullanılır. Bu miktarlar pek çok ulusal ve uluslararası standartta X g (mL) ve 9X mL olarak gösterilir.

Kullanılan Malzeme

Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454)

VRB Agar (Merck 1.01406)

Fluorocult LMX Broth (Merck 1.10620)

Not: Fluorocult LMX Broth besiyeri yoğurt, ayran, peynir, tereyağı, turşu ve istiridye analizleri için uygun değildir. Bu örneklerde sahte pozitif sonuçlara sıklıkla rastlanmaktadır.

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan BGB Broth ya da Fluorocult LMX Broth içinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanıldığında minimum sıvı hacmi uyarınca -örneğin, 25 g gıda + 225 mL broth kullanılma zorunluluğu varsa- homojenizasyon sonrası 10 gram gıda karşılığı olarak 100 mL homojenizat steril erlene alınır.

-Erlen, seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 24 ± 2 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

-BGB Broth erleninde tipik ya da atipik mikrobiyel gelişme görülürse veya gelişme olup olmadığı belirgin değilse, 9 cm çaplı standart boy Petri kutusuna 1 mL aktarılır, üzerine 10–12 mL kadar VRB Agar dökülür. Besiyeri katılaştıktan sonra üzerine $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da tutulan 4–5 mL kadar erimiş VRB Agar besiyeri ikinci kat olarak dökülür. İkinci katın jelleşmesinden sonra Petri kutusu kapağı üzerinde olmak üzere seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 24 ± 2 saat inkübe edilir. İstenirse VRB Agar'a 0,1 mL yayma da yapılabilir. Bu koşulda da ikinci kat dökülmelidir. Bu analizde BGB Broth sadece selektif zenginleştirme besiyeri olarak kullanılır.

-BGB Broth'ta mikrobiyel gelişme yoksa, analiz bitirilir ve analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri olmadığına karar verilir. Bazı standartlara göre BGB Broth'ta gözle görülür bir mikrobiyel gelişme olmasa da VRB Agar'a inokülasyon yapılmalıdır.

-İnkübasyon sıcaklıkları ilgili talimatta ve analiz raporunda belirtilmelidir.

-VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak değerlendirilir (bakınız; Ek B 01) ve "analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri vardır" şeklinde rapor verilir. VRB Agar besiyerinde tipik koloni görülmez ise analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri olmadığına karar verilir. Atipik koloni gelişmesi olursa bunlar ayrı ayrı BGB Broth'a aşılanıp, 30–32 °C'da 24 saat sonra gaz oluşumu izlenir (bakınız; Ek B 02).

-Fluorocult LMX Broth besiyerinde homojenize edilen gıda örneği, seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyeri renginin mavi–yeşile dönüşmesi koliform grup bakteri varlığını gösterir (bakınız; Ek B 05).

-Koliform pozitif çıkan örnekte *E. coli* analizi yapılabilir (bakınız; 14.05. Bölüm).

-Gerekirse Fluorocult LMX Broth'tan da yukarıda gösterildiği şekilde VRB Agar'a ekim yapılabilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

12.05. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz

Su, berrak meyve suları ve suda tam eriyen şeker vb. gıdalarda düşük sayıdaki (bakınız; 06.01.01. Bölüm) koliform grup bakterilerin analizi membran filtrasyon yöntemi ile yapılır.

Gıdaların membran filtrasyonla koliform bakteri analizinde sıklıkla VRB Agar, Chromocult Coliform Agar ya da Chromocult Coliform Agar ES kullanılır. "Lactose TTC Agar with Tergitol 7" besiyeri, ISO 9308'e göre suların membran filtrasyon yöntemi ile analizinde kullanılır. ISO 9308-1 sayılı standart, Türk Standartları Enstitüsü'nden "TS EN ISO 9308-1; Su kalitesi - *Escherichia coli* ve Koliform Bakterilerin Tespiti ve Sayımı - Bölüm 1: Membranla Süzme Yöntemi" adı ile Türkçe kaynak olarak sağlanabilir.

Not 1: Membran filtrasyon uygulamasında seçilen inkübasyon sıcaklığı ne olursa olsun, Petri kutusu inkübatöre tabanı üzerine yerleştirilir. İnkübasyon süresince filtre üzerine su damlası düşmemesi için agar yüzeyi yeteri kadar kuru olmalıdır.

Not 2: Bu uygulama, yağlı süt ürünleri için "genellikle" uygun değildir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
VRB Agar (Merck 1.01406)
Lactose TTC Agar with Tergitol 7 (Merck 1.07680)
Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)
Chromocult Coliform Agar ES (Merck 1.00850)

Not: Membran filtrasyon üreticisi firmalar tarafından ped üzerine emdirilerek hazırlanmış besiyerleri, üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılır.

Analiz

-Öncelikle "07.03. Membran Filtrasyon" bölümüne bakınız. Yöntem şematik olarak Ek A 05'te gösterilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon gerekli ise Maximum Recovery Diluent kullanılır. Yağsız süt ürünleri -ön filtrasyon koşuluyla- ¼ Ringer çözeltisi ile homojenize edilir.

-Örnek, membran filtrasyondan geçirilir ve filtre Petri kutusunda hazırlanmış besiyeri üzerine yerleştirilir. Bu amaçla standart 9 cm ya da filtreye uygun olmak üzere 6 cm çaplı Petri kutuları kullanılır.

-Petri kutusu -kapağı üste gelecek şekilde (tabanı üzerine)- seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 18–24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sıcaklığı, ilgili talimatta ve analiz raporunda belirtilmelidir.

-VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak sayılır (bakınız; Ek B 01). *E. coli* dışındaki koliformlar; Chromocult Coliform Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı pembe–kırmızı renkli koloni (bakınız; Ek B 03), Chromocult Coliform Agar ES besiyerinde ise 1–2 mm çaplı somon–kırmızı renkli koloni oluşturur (bakınız; Ek B 04). Bu uygulamada, her iki besiyerinde de koyu mavi–menekşe renkli *E. coli* kolonilerinin sayısının da koliform grup bakteri sayısına eklenmesi gerekir. *E. coli* varlığı saptanırsa ayrı olarak rapora geçilir.

-Lactose TTC Agar with Tergitol 7 besiyerinde sarı–portakal renkli koloniler (bakınız; Ek B 06) koliform grup bakteri olarak değerlendirilir.

-Sayım ya da var/yok analiz sonuçları standart şekilde verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

12.06. Yüzey Kontrolü

İşletme tezgahı, çalışanların elleri vb. yüzeylerde koliform grup bakteri yükünün belirlenmesi ya da var/yok testi ile analiz edilmesi pek çok işletme için önemlidir.

Kullanılan Malzeme

VRB Agar (Merck 1.01406)
Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)
Chromocult Coliform Agar ES (Merck 1.00850)
Envirocheck Contact C (Merck 1.02136)

Analiz

-Öncelikle bakınız; 07.10. "Yüzey ve Hava Kontrolü" bölümü.

-VRB Agar, Chromocult Coliform Agar ya da Chromocult Coliform Agar ES kullanımında steril svap steril su ile ıslatılır, yüzeye sürülür, sonra svap besiyerine sürülür. Seçilen inkübasyon sıcaklığında 24 ± 2 saat inkübasyona bırakılır.

-VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak değerlendirilir (bakınız; Ek B 01). *E. coli* dışındaki koliformlar; Chromocult Coliform Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı pembe–kırmızı renkli koloni (bakınız; Ek B 03), Chromocult Coliform Agar ES besiyerinde ise 1–2 mm çaplı somon–kırmızı renkli koloni oluşturur (bakınız; Ek B 04). Her iki besiyerinde de koyu mavi–menekşe renkli koloniler *E. coli* olarak değerlendirilir. *E. coli* varlığı saptanırsa, ayrı olarak rapora geçilmelidir.

-Çalışanların parmakları, doğrudan VRB Agar, Chromocult Coliform Agar ya da Chromocult Coliform Agar ES besiyerine değdirilerek aynı analiz yapılabilir.

-Bu yöntemde sonuçlar; "temiz", "az kirli", "orta kirli", "çok kirli" şeklinde göreceli olarak verildiğinden, kontrol edilen yüzey hakkında kabaca bilgi sağlanır.

-Envirocheck Contact C, bir yüzü Chromocult Coliform Agar diğer yüzü toplam bakteri analizi için Plate Count Agar olan esnek bir sistemdir. Plastik kutunun kapağı açılır, esnek bağlantı ile besiyerinin yüzeye tam olarak değmesi sağlanır. Aynı kutuya yerleştirilip, seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 24 ± 2 saat inkübasyon sonunda oluşan 1–2 mm çaplı pembe–kırmızı koloniler koliform grup olarak, koyu mavi–menekşe koloniler ise *E. coli* olarak sayılır. Standart alan kullanıldığı için sayım sonuçları kıyaslanabilir özellik taşır. *E. coli* 'ye rastlanırsa rapor edilmelidir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

MERCK Koliform, Fekal Koliform, *E. coli*, *E. coli* O157 ve Enterobacteriaceae Besiyerleri

A 1 Medium	1.00415	500 g
Brilliant-green 2 %-Bile Broth	1.05454	500 g
BROLAC Agar (Bromothymol-blue Lactose Agar)	1.01639	500 g
CAYE Broth Supplement	1.00051	16 vial
China-blue Lactose Agar	1.02348	500 g
Chromocult® Coliform Agar	1.10426	100 g
CT-Supplement	1.09202	16 vial
Deoxycholate Lactose Agar	1.02894	500 g
DEV ENDO Agar	1.10684	500 g
EC Broth	1.10765	500 g
ENDO Agar	1.04044	500 g
Enterobacteriaceae Enrichment Broth acc. to MOSSEL	1.05394	500 g
Fluorocult® Brilliant Green 2 %-Bile (BRILA) Broth	1.12587	500 g
Fluorocult® DEV Lactose Peptone Broth	1.04037	500 g
Fluorocult® <i>E. coli</i> O157:H7 Agar	1.04036	500 g
Fluorocult® ECD Agar	1.04038	500 g
Fluorocult® LMX Broth modified	1.10620	500 g
Fluorocult® VRB Agar	1.04030	500 g
GN Enrichment Broth acc. to HAJNA	1.10756	500 g
Lactose TTC Agar with Tergitol® 7	1.07680	500 g
Lauryl Sulfate Broth	1.10266	500 g
LEVINE EMB Agar	1.01342	500 g
MacCONKEY Agar	1.05465	500 g
MacCONKEY Broth	1.05396	500 g
mEC Broth with Novobiocin	1.14582	500 g
Membrane-filter ENDO Broth	1.10750	500 g
m-Endo Agar LES	1.11277	500 g
m-FC Agar	1.11278	500 g
mTSB Broth with Novobiocin	1.09205	500 g
Readycult® Coliforms 100	1.01298	20 test
Sorbitol-MacConkey Agar (SMAC Agar)	1.09207	500 g
VRB Agar (Violet Red Bile Agar)	1.01406	500 g
VRBD Agar	1.10275	500 g

13. Fekal Koliform Bakteriler

13.01. Fekal Koliformların EMS Yöntemi ile Sayımı; Standart Yöntem	151
13.02. Sulara Fekal Koliform Bakterilerin EMS Yöntemi ile Hızlı Sayımı	152
13.03. Fekal Koliform Bakterilerin Katı Besiyerinde Sayımı.....	153

Fekal koliformlar, koliform bakteriler grubunun içinde yer alırlar ve doğrudan fekal kontaminasyon indeksi olarak aranılır ya da sayılırlar. Fekal koliform bakteriler ile saptanan üyelerin hemen tamamı *E. coli* olduğu için, günlük uygulamada sadece *E. coli* aranması genellikle yeterlidir. Bununla beraber, özellikle bitkisel ürünlerde *E. coli* bulunmayan, ancak fekal koliform olan örneklerle daha sıklıkla rastlanıldığı göz ardı edilmemelidir. Bunlar "ısıya dayanıklı koliformlar" ya da "termotolerant koliformlar" olarak da anılırlar.

Standart yöntemle fekal koliform analizi EMS yöntemi ile yapılır ve koliform grup bakterilerin analizinin devamı olarak uygulanır. Bununla beraber, su örneklerinde EMS yöntemi ile doğrudan A-1 Broth besiyerine ekim ve sayım (bakınız; 13.02. Bölüm) ve yüksek inkübasyon sıcaklığında olmak kaydıyla doğrudan VRB Agar besiyerine ekim ve sayım da (bakınız; 13.03. Bölüm) söz konusudur.

13.01. Fekal Koliformların EMS Yöntemi ile Sayımı; Standart Yöntem

Fekal koliformlar, ISO 9308'e göre EMS yöntemi ile sayılır. ISO 9308, Türk Standartları Enstitüsü'nden "TS ISO 9308-2; Su Kalitesi - Koliform Organizmalar, Isıya Dayanıklı Koliform ve *Escherichia coli* Varsayılan Organizmaların Tespit Edilmesi ve Sayımı - Bölüm 2: Çoklu Tüp (En Muhtemel Sayı) Metodu" adı ile sağlanabilir.

Not 1: Tüpler mutlaka mikropresör kontrollü su banyosunda inkübe edilmelidir. Standart inkübatörler ve hatta basit su banyoları bu amaçla asla kullanılamaz. Fekal koliform bakteri analizinde su banyosu sıcaklığı kritiktir. Düşük olursa fekal olmayan koliformların da gelişme olasılığı, yüksek olursa fekal koliformların gelişememe olasılığı vardır. Bu nedenle inkübasyon süresince su banyosu sıcaklığı maksimum–minimum termometre ile kontrol edilmelidir.

Not 2: Bazı kaynaklarda inkübasyon sıcaklığı 44,5 °C olarak verilmektedir. ISO 7251 45±0,5 °C'da, FDA ise 45,5±0,2 °C'da inkübasyon önermekte, ancak kabuklu deniz hayvanları ve bunların yetiştirildiği sular için inkübasyonun 44,5±0,2 °C'da yapılması gerektiğini uymaktadır. Uygulanan inkübasyon sıcaklığı ilgili talimata ve rapora yazılmalıdır.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Lauryl Sulfate (LST) Broth (Merck 1.10266)

EC Broth (Merck 1.10765)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı Yöntemi" bölümüne bakınız.

-Çalışma, koliform bakterilerin EMS yöntemi ile aranması olarak başlar (bakınız; 12.02. Bölüm).

-LST Broth besiyerinde gelişme ve gaz oluşumu görülen her tüpten, içinde Durham tüpü olan EC Broth besiyerine 1 öze aşılama yapılır. EC Broth tüpleri 45 °C su banyosunda önceden ısıtılmış olmalıdır.

-İnkübasyon 45 °C'da su banyosunda yapılır. Çoğunlukla ilk 24 saat içinde pozitif sonuç alınmakla beraber, standart analiz yönteminde süre 48 saattir.

-İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve gaz görülen tüpler, "fekal koliform grup pozitif" olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak fekal koliform sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Aşağıda EMS yöntemi ile fekal koliform sayımında EMS kodu için bir örnek verilmiştir.

Besiyeri	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Kod
LST Broth	+++	+-+	--+	321
EC Broth	+-+	-*-	*-*-	200

*: Bir önceki serideki negatif tüpten bu besiyerine ekim yapılmaz.

13.02. Sularda Fekal Koliform Bakterilerin EMS Yöntemi ile Hızlı Sayımı

Standart EMS yöntemi ile fekal koliform bakteri sayımı 4 güne kadar uzayabilmektedir. Sularda A-1 Broth besiyeri kullanılarak bu süre 1 güne düşürülmektedir.

A-1 Broth besiyeri US–EPA (United States–Environmental Protection Agency; ABD Çevre Koruma Ajansı) standart su analiz yöntemlerine uygundur. Sularda fekal koliform bakterilerin EMS yöntemi ile tek aşamalı besiyeri kullanılarak belirlenmesi, hızlı analiz yöntemi olarak değerlendirilir.

Kullanılan Malzeme

A-1 Broth (Merck 1.00415)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı Yöntemi" bölümüne bakınız.

-Su örneği mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Seyreltme yapmaya gerek yoktur.

-Büyük tüplerde hazırlanmış çift kuvvetli 3 tüpe (bakınız; 03.03.04. Bölüm)10'ar mL ve standart tüplerde hazırlanmış 3 tüpe 1'er mL ve diğer 3 tüpe 0,1'er mL ekilir.

-Tüpler $35\pm0,5$ °C'da 3 saat ve ardından su banyosunda $44,5$ °C da 21 ± 2 saat süre ile inkübe edilir. İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve gaz görülen tüpler, "fekal koliform grup pozitif" olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak sayı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

13.03. Fekal Koliform Bakterilerin Katı Besiyerinde Sayımı

Gıdalardaki fekal koliform sayısı VRB Agar besiyerinde de belirlenebilir. Bu yöntem, var/yok testi amacıyla da kullanılabilir.

Not 1: 44 °C'da standart inkübatörde yapılan inkübasyon oldukça risklidir. Besiyeri sıcaklığı 44 °C'a çıkana kadar geçen süre içinde ve/veya inkübatörün kapağının sürekli açılıp, kapanması sırasında hava sıcaklığının değişmesine bağlı olarak bu sıcaklıkta gelişemeyecek olan koliform bakteriler de gelişip, fekal koliform olarak sayılabilir. Bu nedenle inkübatör sıcaklığı inkübatöre konulacak beher içindeki suyun sıcaklığı ile kontrol edilmeli, inkübasyon sırasında kapağın açılıp kapanması olabildiğince önlenmeli ve inkübasyon süresince inkübatördeki sıcaklık değişimi tercihen kaydedicili bir termometre ile izlenmelidir.

Not 2: Yüksek inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak, Petri kutusundaki örnek üzerine 15 mL kadar VRB Agar ve 2. kat olarak 7–8 mL kadar besiyeri dökülmesi, Petri kutusunun mutfak tipi strech filme sarılarak inkübe edilmesi, inkübatörde su dolu bir beher bulundurulması önerilir. Bu şekilde besiyerinde kuruma önlenir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

VRB Agar (Merck 1.01406)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-Dökme yönteminde 15 mL besiyeri dökülmesi önerilir. Tam jelleşmeden sonra, yayma yönteminde ise besiyerinin sıvıyı emmesinden sonra 45–50 °C'da tutulan 7–8 mL kadar erimiş VRB Agar besiyeri ikinci kat olarak dökülür. İkinci katın da tam olarak jelleşmesinden sonra Petri kutuları kapakları üzerine çevrilerek, 44 °C'a ayarlanmış inkübatöre yerleştirilir.

-Bu inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat inkübasyon sonunda VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler fekal koliform grup bakteri olarak sayılır (bakınız; Ek B 01).

-Fekal Koliform grup sayısı standart şekilde hesaplanır ve kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

14. *Escherichia coli*

14.01. Katı Besiyerinde Sayım.....	156
14.02. EMS Yöntemi ile Sayım; Standart Analiz	158
14.03. EMS Yöntemi ile Sayım; Hızlı MUG Tekniği	159
14.04. Sularda Var/yok Testi	161
14.05. Gıdalarda Var/yok Testi	162
14.06. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz	164
14.07. Yüzey Kontrolü	166

En tipik Gram negatif bakteridir. Sıcak kanlı hayvanların (memeliler ve kanatlılar) bağırsak sistemlerinde bulunur. Bu nedenle herhangi bir örnekte *E. coli* 'ye rastlanması o örneğe doğrudan ya da dolaylı olarak kanalizasyon suyu ile dışkı bulaştığının kesin göstergesidir. Tüketime hazır gıdada *E. coli* bulunması istenmez. Standart analizlerde bulunan tip 1, primer patojen değildir. Varlığı, bağırsak kökenli *Salmonella* vb. patojenlerin potansiyel olarak bulunabileceğini gösterir.

Gıdalarda standart yöntemle *E. coli* aranması EMS yöntemi ile yapılmakta ve bu analiz uluslararası kontrol kuruluşları tarafından önerilen standartlara göre 5–10 gün sürmektedir. MUG'lu besiyerlerinin (Fluorocult) kullanılması ile bu süre 24–48 saate düşmüştür.

E. coli serotiplerinin %98–99 kadarı β -D-glucuronidase enzimi içerir. Diğer bakterilerde çok ender olarak görülen bu enzim 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) substratını parçalar ve parçalanma ürünlerinden 4-methylumbelliferone uzun dalga boylu (366 nm) UV lambası ile floresan ışımaya verir. Bu enzimin varlığı kromojenik besiyerlerinde de belirlenebilir.

MUG, VRB Agar gibi katı besiyerlerine katıldığı gibi LST Broth gibi sıvı besiyerlerine de katılmakta, ayrıca Bactident *E. coli* gibi test şeritleri ile de kullanılmaktadır. MUG yöntemi FDA tarafından hızlı *E. coli* analizinde 1998 yılından beri kullanılmaktadır. ISO'da da bu yöntem benimsenmiştir.

E. coli suşları içinde %1–2 oranında MUG negatif olması *E. coli* sayımında standart analiz yöntemine göre %1–2 oranında daha az sayım sonucu alınacağını gösterir. Bununla beraber, standart EMS yöntemi *E. coli* analizinin 5 gün sürmesi, su banyosu sıcaklığının kritik olması nedeni ile bu yöntemde de hata şansının olması gibi dezavantajlar dikkate alındığında MUG yöntemi özellikle günlük gıda analizlerinde yaygın kullanım alanı bulmuş ve uluslararası standartlarda hızlı yöntem olarak kabul görmüştür. Koloni identifikasyon tekniği ile sayımda IMViC ya da IMVEC testlerinin 3 gün sürmesinin getirdiği olumsuzluğu gidermek amacı ile katı besiyerlerinde de MUG tekniği yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Not 1: Bazı cam tüpler kendiliğinden floresan ışıma verirler. Analize başlamadan önce boş tüp UV lambası ile kontrol edilmeli, bunlardan kendiliğinden floresan ışıma verenler MUG esaslı analizlerde kullanılmamalıdır. MUG esaslı analizlerde kullanılacak cam malzeme siparişinde "kendiliğinden floresan ışıma vermeyen" tüp istendiği özellikle belirtilmelidir. Bu güne kadar Petri kutularında, erlenlerde ve şişelerde kendiliğinden floresan verenlere rastlanılmamıştır. Bununla beraber, MUG esaslı çalışmalarda kullanılacak cam malzemelerin önceden "kendiliğinden floresan verip vermediği" kontrol edilmelidir.

Not 2: Farklı standartlarda *E. coli* için inkübasyon sıcaklığı 35 °C ve 37 °C olarak verilmektedir. İnkübasyon sıcaklığı, analiz raporuna yazılmalıdır.

Not 3: MUG esaslı testlerde UV El Lambası yerine çok daha ucuza sağlanabilen ve "sahte para belirleme makinesi" olarak bilinen cihazın kullanımı da söz konusudur. Bu konu üzerinde yapılan çalışmalar UV el lambası yerine bu cihazın kullanılabileceğini göstermiştir. Bununla beraber, uluslararası düzeyde bu konu henüz onaylanmamıştır ve sahte para makinelerinin hepsinin bu amaçla kullanılıp kullanılamayacağı belirgin değildir. Günlük analizlerde "UV El Lambası" yerine "Sahte Para Belirleme Makinesi" tercihi kullanıcının tercihine bırakılmıştır.

14.01. Katı Besiyerinde Sayım

Koliform grup bakterilerin analizinde olduğu gibi *E. coli* sayımında da pek çok besiyeri olmakla birlikte, VRB Agar, VRB Agar+MUG, Chromocult Coliform Agar ve Chromocult Coliform Agar ES besiyerleri günlük gıda analizlerinde yaygın olarak kullanılan besiyerleridir. Chromocult TBX Agar ise ISO 16649'a göre gıda ve yemlerde *E. coli* sayımı için önerilmektedir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
VRB Agar (Merck 1.01406)
VRB Agar+MUG (Merck 1.04030)
Bactident *E. coli* (Merck 1.13303)
UV El Lambası (Merck 1.13203)
Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)
Chromocult Coliform Agar ES (Merck 1.00850)
Chromocult TBX Agar (Merck 1.16122)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-Dökme yönteminde tam jelleşmeden sonra, yayma yönteminde ise besiyerinin sıvıyı emmesinden sonra 45–50 °C'da tutulan 4–5 mL kadar erimiş VRB Agar besiyeri ikinci kat olarak dökülür. İkinci katın da tam olarak jelleşmesinden sonra Petri kutuları kapakları üzerine çevrilerek, inkübatöre yerleştirilir.

-VRB Agar besiyerinde 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda 1–2 mm çaplı koyu kırmızı koloniler (bakınız; Ek B 01) koliform grup bakteri olarak sayılır. Bunlardan rastgele 10 adedi seçilir, her koloni 0,2 mL steril suda çözülür ve ayrı ayrı Bactident *E. coli* test kitinin küvetlerine yerleştirilir. Küvetlere 1 adet test şeridi ilave edilir, 2 saat inkübasyon sonunda UV el lambası (bakınız; Ek B 08) ile floresan ışığa kontrol edilir. Floresan ışığa gösteren koloniler *E. coli* olarak değerlendirilir. İdentifikasyon esaslı sayım tekniği (bakınız; 07.01.05. Bölüm) ile Petri kutusundaki kolonilerin ne kadarının *E. coli* olduğu belirlenir, buradan gıda örneğindeki *E. coli* sayısı hesaplanır ve standart kurallara göre sonuç verilir.

-VRB+MUG Agar besiyerinde 37 °C'da 18 saat inkübasyon sonunda 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler UV el lambası ile kontrol edilir. Bunlardan floresan ışığa verenler (bakınız; Ek B 09) *E. coli* olarak işaretlenir. VRB+MUG Agar besiyerinin 18 saatten uzun süre inkübasyon yapılması halinde floresan ışığa yayılmakta ve tüm Petri kutusunu kaplayarak pozitif ve negatif kolonilerin ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle VRB+MUG Agar besiyeri 18 saat süre ile inkübe edilir.

-Chromocult Coliform Agar (bakınız; Ek B 03) ve Chromocult Coliform Agar ES (bakınız; Ek B 04) besiyerinde 37 °C'da 24±2 saat inkübasyon sonunda 1–2 mm çaplı koyu mavi–menekşe renkli koloniler *E. coli* olarak sayılır.

-Chromocult TBX Agar besiyerinde ISO 16649 dökme yöntemi ile çalışılmasını önermektedir. Analiz yapılan örnekte dondurma, kurutma, ısıtma, kimyasal madde uygulaması gibi nedenlerle hasar görmüş bakteriler olduğundan kuşku duyuluyorsa inkübasyon önce 30–37 °C'da 4 saat, arkasından 44±1 °C'da 18–20 saat, aksi halde doğrudan 44±1 °C'da 18–24 saat yapılır. İnkübasyon sonunda mavi–yeşil renkli tüm koloniler (bakınız; Ek B 10) *E. coli* olarak sayılır.

-Koliform grup bakteri sayısı standart şekilde hesaplanır ve sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

14.02. EMS Yöntemi ile Sayım; Standart Analiz

E. coli analizi standart olarak (ISO 7251) EMS yöntemi ile yapılır ve fekal koliform grup bakterilerin analizinin devamı olarak uygulanır. ISO 7251, Türk Standartları Enstitüsü'nden "TS 6063, Mikrobiyoloji – Muhtemel *Escherichia coli* Sayımı için Genel Kurallar En Muhtemel Sayı Tekniği" adı ile sağlanabilir.

Not 1: İnkübasyon mutlaka mikropresör kontrollü su banyosunda yapılmalıdır. Standart inkübatörler ve normal su banyoları bu amaçla asla kullanılamaz. Fekal koliform ve *E. coli* analizinde su banyosu sıcaklığı kritiktir. Düşük olursa fekal olmayan koliformların da gelişme olasılığı, yüksek olursa *E. coli* 'nin gelişememe olasılığı vardır. Bu nedenle inkübasyon süresince su banyosu sıcaklığı maksimum–minimum termometre ile kontrol edilmelidir.

Not 2: Bazı kaynaklarda inkübasyon sıcaklığı, 44,5 °C olarak verilmektedir. ISO 7251 45±0,5 °C, FDA ise 45,5±0,2 °C'da inkübasyon önermekte, ancak kabuklu deniz hayvanları ve bunların yetiştirildiği suların analizi için inkübasyonun 44,5±0,2 °C'da yapılması gerektiğini uyarmaktadır. Seçilen inkübasyon sıcaklığı ilgili talimata ve rapora yazılmalıdır.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Lauryl Sulfate (LST) Broth (Merck 1.10266)

EC Broth (Merck 1.10765)

Tryptone Water (TW) (Merck 1.10859)

Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız. Çalışma, koliform bakterilerin EMS yöntemi ile sayımı (bakınız; 12.02. Bölüm) olarak başlar, fekal koliform bakterilerin EMS yöntemi ile sayımı (bakınız; 13.01. Bölüm) şeklinde devam eder.

-EC Broth besiyerinde gaz oluşumu görülen her tüpten Tryptone Water (TW) besiyerine 1 öze aşılama yapılır. TW Broth tüpleri önceden 45 °C su banyosunda ısıtılmış olmalıdır. İnkübasyon, 45 °C su banyosunda 24 saat süre ile yapılır.

-İnkübasyon bitiminde bulanıklık görülen TW Broth tüplerine 1'er mL Kovacs' indol çözeltisi damlatılır ve tüp elle yavaşça karıştırılır. En geç 1 dakika içinde (çoğu defa 5–10 saniye içinde) tüpün üstünde vişne çürüğü renkli halka oluşması indol testinde pozitif sonuçtur (bakınız; Ek B 11). *E. coli*, indol pozitif bir bakteridir. Dolayısı ile bu tüpler, *E. coli* pozitif olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak sayı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır. İndol testi uygulanmış tüpler otoklavlanmaz, 1 gece kendi halinde bırakılarak kendiliğinden (oto) sterilizasyon sağlanır.

Aşağıda EMS yöntemi ile *E. coli* sayımında EMS kodu için bir örnek verilmiştir.

Besiyeri	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Kod
LST Broth	+++	+ - +	- - +	321
EC Broth	+ - +	- * -	* * -	200
TW	- * +	* * *	* * *	100

*: Bir önceki serideki negatif tüpten bu besiyerine ekim yapılmaz.

14.03. EMS Yöntemi ile Sayım; Hızlı MUG Tekniği

Bu yöntemde koliform grup bakteriler ve *E. coli* beraberce sayılır. Bir diğer deyiş ile ekimi yapılan tüpler önce standart yöntemle koliform bakteri açısından değerlendirilir, koliform grup pozitif olanlar UV el lambası ile *E. coli* açısından kontrol edilir. FDA'dan sonra ISO da (ISO 11866-2) MUG yöntemini, süt ürünlerinde *E. coli* 'nin EMS yöntemi ile sayımında LST Broth katkısı olarak benimsemiştir. Fluorocult LST (MUG) Broth'ta MUG, besiyeri bileşimine katılmıştır, ayrıca katkı ilavesi söz konusu değildir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
Fluorocult LST (MUG) Broth (Merck 1.12588)
UV El Lambası (Merck 1.13203)
Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293)
1 N NaOH (Merck 1.06462)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak Fluorocult LST Broth tüplerine ekim yapılır. Gerekliyse Fluorocult LST Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-İnkübasyon, 37 °C'da 24±2 saat süre ile yapılır. Bazı standartlarda üreme (gaz) görülmemesi halinde ilave 24±2 saat daha inkübasyon önerilmektedir. Günlük kontrolde 24 saat inkübasyon yeterlidir.

-İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve gaz görülen tüpler, "koliform grup pozitif" olarak işaretlenir. EMS çizelgesinden yararlanılarak koliform grup bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Koliform grup pozitif olan tüpler UV el lambası (bakınız; Ek B 08) ile tercihen loş bir yerde kontrol edilir. Bunlardan floresan ışığa verenler (bakınız; Ek B 12) *E. coli* pozitif olarak işaretlenir. EMS çizelgesinden yararlanılarak *E. coli* sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir. Koliform negatif tüpler UV lamba ile kontrol edilmez.

-MUG reaksiyonunda sahte pozitif sonuçlardan kaçınmak için indol testi uygulanabilir. Floresan ışığa görülen tüplere 1 mL Kovacs' indol çözeltisi damlatılır, elle yavaşça karıştırılır, en geç 1 dakika (genellikle 5–10 saniye) içinde besiyeri yüzeyinde vişne çürüğü renkli halka toplanması indol testinin (bakınız; Ek B 11) pozitif olduğunu gösterir. *E. coli* MUG ve indol pozitif tek bakteridir. MUG negatif tüplere indol testi uygulanmaz. Fluorocult LST Broth'ta indol testi yapılabilir, ilave bir aşımaya gerek yoktur. Günlük gıda kontrolünde pozitif MUG sonuçlarının indol testi ile doğrulanması gerekli değildir. Bu test daha çok araştırma esaslı çalışmalarda uygulanır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır. İndol testi uygulanmış tüpler otoklavlanmaz, bunlar bir gece boyunca kendi halinde bırakılarak kendiliğinden (oto) sterilizasyon sağlanır.

Not: Tüp içinde aşırı asit gelişimi floresan ışığı maskeleyebilir ve sonuç kesin olarak belirlenemeyebilir. Bu durumda tüpe 1 mL 1 N NaOH (4 g/100 mL) ilavesi, karıştırılması ve tekrar floresan kontrolü gerekir. NaOH ilavesi daha sonra yapılacak indol testini etkilemez.

14.04. Sulara Var/yok Testi

100 mL su örneğinde *E. coli* olup olmadığının kontrolüdür. Günlük uygulamada içme ya da kullanma suyu ile proses suyu gibi *E. coli* olmaması gereken örnekler için uygulanır.

Kullanılan Malzeme

ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298)
UV El Lambası (Merck 1.13203)
Kovacs' İndol Çözültisi (Merck 1.09293)
1 N NaOH (Merck 1.06462)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Su örneği mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir, steril uygun bir kaba (erlen, şişe vb.) 100 mL olarak aktarılır.

-Önceden ısıtılarak sterilize edilmiş besiyerinin ambalajı aseptik koşullara uyularak açılır, dehidre besiyerinin tümü su örneğine aktarılır, tüm partiküller eriyinceye kadar elle ve yavaşça karıştırılır.

-İnkübasyon sonrasında (37 °C'da 24±2 saat) besiyeri renginin mavi–yeşile dönüşmesi, analiz edilen suda koliform bakteri varlığını gösterir ve "100 mL suda koliform bakteri var" şeklinde sonuç verilir. Besiyeri rengi değişmezse "100 mL suda koliform grup bakteri ve dolayısı ile *E. coli* olmadığı" anlaşılır. İnkübasyon sonunda orijinal sarı renk korunuyor -ancak bulanıklık varsa (bakınız; Ek A 04)-koliform grup dışında bakteriyel gelişmeye karar verilir ve analiz sonucu yine "100 mL suda koliform grup bakteri ve dolayısı ile *E. coli* yok" şeklinde düzenlenir.

-Koliform pozitif bulunan erlen tercihen loş bir yerde UV lambası ile kontrol edilir. Floresan ışımaya (bakınız; Ek B 13) erlen *E. coli* olduğunu gösterir ve "100 mL suda *E. coli* var" şeklinde, floresan ışımaya görülmezse "100 mL suda *E. coli* yok" şeklinde sonuç verilir. Koliform negatif örneklerde floresan testi yapılmaz.

-MUG reaksiyonunda sahte pozitif sonuçlardan kaçınmak için indol testi uygulanabilir. Floresan ışımaya görülen erlene 5 mL Kovacs' indol çözeltisi ilave edilir, elle yavaşça karıştırılır, en geç 1 dakika içinde (genellikle 5–10 saniye) erlen üzerinde vişne çürüğü renkli halka toplanması indol testinin pozitif olduğunu gösterir. *E. coli* MUG ve indol pozitif tek bakteridir. MUG negatif erlenlere indol testi uygulanmaz. Günlük testlerde indol testi mutlak gerekli değildir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır. İndol testi uygulanmış erlenler otoklavlanmaz, bunlar bir gece kendi halinde bırakılarak kendiliğinden (oto) sterilizasyon sağlanır.

Not: Erlen içinde aşırı asit gelişimine bağlı olarak floresan ışıma kesin olarak belirlenemeyebilir. Bu durumda erlene 10 mL 1 N NaOH (4 g/100 mL) ilavesi, karıştırılması ve tekrar floresan kontrolü gerekir. NaOH ilavesi daha sonra yapılacak indol testini etkilemez.

14.05. Gıdalarda Var/yok Testi

Bu metinde 10 g (mL) gıda örneğinde var/yok testi ile *E. coli* analizi verilmiştir. 1, 5, 25 g (mL) vb. gibi miktarların analizinde miktar ile orantılı olarak besiyeri hacmi değişir. Genel olarak gıdanın 9–10 misli sıvı besiyeri kullanılır.

Kullanılan Malzeme

Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454)
Fluorocult LMX Broth (Merck 1.10620)
Fluorocult VRB+MUG Agar (Merck 1.04030)
UV El Lambası (Merck 1.13203)
Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293)
1 N NaOH (Merck 1.06462)

Not: Fluorocult LMX Broth besiyeri yoğurt, ayran, peynir, tereyağı, turşu analizleri için uygun değildir.

Analiz

-Öncelikle bakınız; 07.08. "Var/yok Testleri" bölümü.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan BGB Broth ya da Fluorocult LMX Broth içinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanıldığında minimum sıvı hacmi uyarınca -örneğin, 25 g gıda + 225 mL broth kullanılma zorunluluğu varsa- homojenizasyon sonrası 10 gram gıda karşılığı olarak 100 mL homojenizat steril erlene alınır.

-Erlen 37 °C'da inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

-Sıvı besiyerlerinde mikrobiyel gelişme yoksa, analiz bitirilir ve analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri olmadığına karar verilir. Bazı standartlara göre sıvı besiyerinde gözle görülür bir mikrobiyel gelişme olmasa da Fluorocult VRB Agar'a inokülasyon yapılmalıdır.

-BGB Broth erleninde tipik ya da atipik mikrobiyel gelişme görülürse veya gelişme olup olmadığı belirgin değilse, 9 cm çaplı standart boy Petri kutusuna 1 mL aktarılır, üzerine 10–12 mL kadar Fluorocult VRB Agar dökülür. Besiyeri katılaştıktan sonra üzerine 45–50 °C'da tutulan 4–5 mL kadar erimiş Fluorocult VRB Agar besiyeri ikinci kat olarak dökülür. İkinci katın jelleşmesinden sonra Petri kutusu kapağı üzerinde olmak üzere 37 °C inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat inkübe edilir. İstenirse VRB Agar'a 0,1 mL yayma da yapılabilir. Bu koşulda da ikinci kat dökülmelidir. Bu analizde BGB Broth sadece selektif zenginleştirme besiyeri olarak kullanılır.

-Fluorocult VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak değerlendirilir (bakınız; Ek B 01) ve "analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri vardır" şeklinde rapor verilir. Fluorocult VRB Agar besiyerinde tipik koloni görülmez ise "analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri ve dolayısı ile *E. coli* olmadığına" karar verilir. Tipik koliform bakteri kolonileri varsa bunlar tercihen loş bir ortamda uzun dalga boylu UV el lambası (bakınız; Ek B 08) ile kontrol edilir. Petri kutusunda floresan ışığa veren koloniler *E. coli* 'dir (bakınız; Ek B 09). Bu kolonilere rastlanırsa "analiz edilen 10 g (mL) gıdada *E. coli* vardır" şeklinde rapor verilir. Tipik koliform grup kolonileri içinden floresan ışığa veren yoksa bu kez "analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri vardır, ancak *E. coli* yoktur" şeklinde rapor verilir.

-Fluorocult LMX Broth besiyerinde homojenize edilen gıda örneği, seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyeri renginin mavi–yeşile dönüşmesi koliform grup bakteri varlığını gösterir. Bu renge dönüşmüş erlen tercihen loş bir yerde uzun dalga boylu UV el lambası ile kontrol edilir. Erlende floresan ışığa (bakınız; Ek B 14) görülürse "analiz edilen 10 g (mL) gıdada *E. coli* vardır" şeklinde rapor verilir. Rengi mavi–yeşile dönüşmüş erlende floresan ışığa yoksa bu kez "analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri vardır, ancak *E. coli* yoktur" şeklinde rapor verilir. Erlende orijinal sarı renk korunuyor ama mikrobiyel gelişmeye bağlı bulanıklık varsa ya da hiç gelişme yoksa "analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri ve dolayısı ile *E. coli* olmadığına" karar verilir.

-MUG reaksiyonunda sahte pozitif sonuçlardan kaçınmak için indol testi uygulanabilir. Floresan ışığa görülen erlene 5 mL Kovacs' indol çözeltisi ilave edilir, elle yavaşça karıştırılır, en geç 1 dakika içinde (genellikle 5–10 saniye) erlen üzerinde vişne çürüğü renkli halka toplanması indol testinin pozitif olduğunu gösterir (bakınız; Ek B 11). *E. coli* MUG ve indol pozitif tek bakteridir.

-MUG negatif erlenlere indol testi uygulanmaz. Günlük testlerde indol testi mutlak gerekli değildir.

-Gerekirse Fluorocult LMX Broth'tan da yukarıda gösterildiği şekilde Fluorocult VRB Agar'a ekim yapılabilir. LMX kültürüne indol testi ve/veya floresan ışımının belirginleştirilmesi için NaOH ilavesi yapılacaksa, önce 1–2 mL kültür steril bir tüpe alınarak VRB Agar inokülümü (aşısı) olarak korunmalıdır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır. İndol testi uygulanmış erlenler otoklavlanmaz, bunlar 1 gece kendi halinde bırakılarak kendiliğinden (oto) sterilizasyon sağlanır.

Not 1: VRB+MUG Agar besiyerinin 18 saatten uzun süre inkübe edilmesi halinde floresan ışımaya yayılmakta ve tüm Petri kutusunu kaplayarak pozitif ve negatif kolonilerin ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle sayım esaslı çalışmalarda VRB+MUG Agar besiyeri 18 saat süre ile inkübe edilmekle beraber, burada olduğu gibi var/yok testinde floresan ışımının yayılmasının bir önemi yoktur, hatta pozitif sonucun daha belirgin şekilde değerlendirilmesi açısından 24 saatlik inkübasyon önerilir.

Not 2: Fluorocult LMX Broth besiyerinde aşırı asit gelişimine bağlı olarak floresan ışımaya maskelenebilir ve reaksiyon belirgin şekilde alınamayabilir. Bu durumda erlene 10 mL 1 N NaOH ilave edilir, elle karıştırılır ve floresan tekrar kontrol edilir. Floresan pozitif sonuç alındıktan sonra sahte pozitif sonuçtan kaçınmak istenirse erlene 5 mL Kovacs' indol ayırıcı damlatılıp elle karıştırılır, en geç 1 dakika (genellikle 5–10 saniye) içinde besiyerinin üstünde vişne çürüğü renkli halka görülmesi *E. coli* varlığını kesinleştirir. NaOH ilave edilmiş olması indol testini etkilemez.

14.06. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz

Gıdalardaki *E. coli* sayısını membran filtrasyon yöntemi ile belirlenebilir. Var/yok testi amacıyla da kullanılabilir. Chromocult TBX Agar besiyeri ISO 16649'a göre gıda ve yemlerde *E. coli* analizi için önerilmektedir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Fluorocult VRB+MUG Agar (Merck 1.04030)

Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)

Chromocult Coliform Agar ES (Merck 1.00850)

Chromocult TBX Agar (Merck 1.16122)

UV El Lambası (Merck 1.13203)

Not: Membran filtrasyon üreticisi firmalar tarafından ped üzerine emdirilerek hazırlanmış besiyerleri üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılır.

Analiz

-Öncelikle "07.03. "Membran Filtrasyon" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon gerekli ise Maximum Recovery Diluent kullanılır. Yağsız süt ürünleri -ön filtrasyon koşuluyla- ¼ Ringer çözeltisi ile homojenize edilir.

-Örnek, membran filtrasyondan geçirilir ve filtre Petri kutusunda hazırlanmış besiyeri üzerine yerleştirilir. Bu amaçla standart 9 cm ya da filtreye uygun olmak üzere 6 cm çaplı Petri kutuları kullanılır.

- Fluorocult VRB Agar, Chromocult Coliform Agar ve Chromocult Coliform Agar ES Petri kutuları -kapağı üste gelecek şekilde (tabanı üzerine)- 37 °C'da inkübasyon sıcaklığında 18–24 saat inkübasyona bırakılır. Fluorocult VRB Agar sayım için 18 saat, var/yok testi için 24 saat inkübe edilir. Chromocult TBX Agar'ın inkübasyon parametresi farklıdır.

-Fluorocult VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak sayılır (bakınız; Ek B 01). Tipik koliform kolonileri varsa tercihen loş bir yerde uzun dalga boylu UV lambası ile kontrol edilir. Floresan ışımada *E. coli* varlığının göstergesidir. *E. coli*, Chromocult Coliform Agar'da (bakınız; Ek B 03) ve Chromocult Coliform Agar ES besiyerinde (bakınız; Ek B 04) koyu mavi–menekşe renkli koloni oluşturur.

-Chromocult TBX Agar besiyeri ISO 16649 tarafından önerilmektedir. Bu standartta, analiz yapılan örnekte dondurma, kurutma, ısıtma, kimyasal madde uygulaması gibi nedenlerle hasar görmüş bakteriler olduğundan kuşku duyuluyorsa inkübasyonun önce 30 ya da 37 °C'da 4 saat, arkasından 44±1 °C'da 18–20 saat yapılması, aksi halde doğrudan 44±1 °C'da 18–24 saat yapılması önerilmektedir. Inkübasyon sonunda mavi–yeşil renkli tüm koloniler (bakınız; Ek B 10) *E. coli* olarak sayılır ve örnekteki sayı standart yöntemle hesaplanır.

-Sayım ya da var/yok analiz sonuçları standart şekilde verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

14.07. Yüzey Kontrolü

İşletme tezgahı, çalışanların elleri vb. yüzeylerde *E. coli* yükünü belirlemek.

Kullanılan Malzeme

Fluorocult VRB+MUG Agar (Merck 1.04030)
Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)
Chromocult Coliform Agar ES (Merck 1.00850)
Envirocheck Contact C (Merck 1.02136)
UV El Lambası (Merck 1.13203)

Analiz

-Öncelikle "07.10. Yüzey ve Hava Kontrolü" bölümüne bakınız.

-Fluorocult VRB Agar, Chromocult Coliform Agar ya da Chromocult Coliform Agar ES kullanımında steril swap steril su ile ıslatılır, yüzeye sürülür, sonra swap besiyerine sürülür. 37 °C'da 24±2 saat inkübasyona bırakılır.

-Fluorocult VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak sayılır (bakınız; Ek B 01). Tipik koliform kolonileri varsa tercihen loş bir yerde uzun dalga boylu UV lambası ile kontrol edilir. Floresan ışıkla *E. coli* varlığının göstergesidir (bakınız; B 09). *E. coli*, Chromocult Coliform Agar'da (bakınız; Ek B 03) ve Chromocult Coliform Agar ES besiyerinde (bakınız; Ek B 04) koyu mavi–menekşe renkli koloni oluşturur.

-Çalışanların parmakları, doğrudan Fluorocult VRB Agar, Chromocult Coliform Agar ya da Chromocult Coliform Agar ES besiyerine değdirilerek aynı analiz yapılabilir.

-Bu yöntemde sonuçlar; "temiz", "az kirli", "orta kirli", "çok kirli" şeklinde göreceli olarak verildiğinden, kontrol edilen yüzey hakkında kabaca bilgi sağlanır.

-Envirocheck Contact C, bir yüzü Chromocult Coliform Agar diğer yüzü toplam bakteri analizi için Plate Count Agar olan esnek bir sistemdir (bakınız; Ek B 07). Plastik kutunun kapağı açılır, esnek bağlantı ile besiyerinin yüzeye tam olarak değmesi sağlanır. Aynı kutuya yerleştirilip, seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat inkübasyon sonunda oluşan 1–2 mm çaplı pembe–kırmızı koloniler koliform grup olarak, koyu mavi–menekşe koloniler ise *E. coli* olarak sayılır. Standart alan kullanıldığı için sayım sonuçları kıyaslanabilir özellik taşır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

15. *Escherichia coli* O157:H7 Serotipi

15.01. Var/yok Testi ile Standart Analiz	167
15.02. Singlepath <i>E. coli</i> O157 Kiti ile Hızlı Tayin	168
15.03. Verotoksin Belirlenmesi	169

Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 serotipi bu gün için bilinen en tehlikeli gıda kaynaklı patojen bakterilerden birisidir. Hiçbir gıda ve gıda ham maddesinde bulunmasına izin verilmez. Analizi 25 g (mL) gıdada var/yok testi şeklinde yapılır. Doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaşma riski olan gıdalarda ve özellikle gıda ham maddelerinde günlük kontrol olarak yapılmalıdır.

Not 1: *E. coli* O157:H7 serotipi, bilinen gıda kaynaklı patojenler içinde en tehlikeli olanlardan birisidir. Analizinde gereken dikkat gösterilmeli ve deneyimsiz kişiler asla bu bakteriyi analiz etmemelidir. Benzer şekilde yeterli fiziksel donanımı olmayan mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu bakterinin analizi yapılmamalıdır. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlar olduğu bildirilmektedir.

Not 2: Çalışmalar sırasında bakterinin ağız yolu ile ya da derideki kesik vb. açık yerlerden vücuda girdiği fark edilirse asla antibiyotik alınmamalı, derhal tıbbi müdahaleye başvurulmalıdır. *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımı olumsuz sonuç verebilmektedir.

Not 3: Analizler, *E. coli* O157 serotipi üzerine kurulmuştur. *E. coli* O157 olarak elde edilen izolatın *E. coli* O157:H7 olup olmadığı, ancak H7 antiserumu kullanılarak veya verotoksin oluşturup oluşturmadığının analizi ile belirlenebilir.

15.01. Var/yok Testi ile Standart Analiz

E. coli O157:H7 serotipinin standart yöntemle gıdalarda varlığının araştırılması standart analizdir. Bu bölümde verilen mTS Broth ve CT-SMAC Agar'daki selektif izolasyon aşamaları ISO 16654'e uygundur.

Kullanılan Malzeme

mTS Broth (Merck 1.09205)
mEC Broth (Merck 1.14582)
SMAC Agar (Merck 1.09207)
SMAC Agar CT Katkısı (Merck 1.09202)
Singlepath *E. coli* O157 Test Kiti (Merck 1.04141)

Not: mEC Broth besiyerinin et ürünlerinde, mTS Broth besiyerinin süt ürünlerinde kullanılması önerilmektedir.

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan modifiye Tryptic Soy (mTS) Broth ya da modifiye EC (mEC) Broth besiyerinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir. Besiyerleri 37 °C'da 24 saat inkübe edilir. Her iki besiyeri de novobiosin içermekte olup, otoklav sonrası ayrıca novobiosin ilavesine gerek yoktur. Bu özellik, sadece granül yapısında olan besiyerlerinde vardır.

-Cefixime–Tellurite (CT) ilave edilmiş Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar'a öze ile sürme ve/veya 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} seyreltilerden 0,1'er mL yayma yapılır, sonra 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.

-Bu süre sonunda besiyerinde oluşmuş renksiz koloniler (bakınız; Ek B 15) muhtemel *E. coli* O157:H7 olarak izole edilir. Bunlara O157 ve H7 antiserumları ile doğrulama yapılır ya da koloni doğrudan 0,2 mL damıtık su içinde çözülüp, Singlepath *E. coli* O157 test kiti ile kontrol edilir.

-Singlepath *E. coli* O157 test kiti uygulanmasında; kitin örnek aktarma bölgesine 15 dakika kaynar su banyosunda tutulup, oda sıcaklığına getirilmiş olan bu suspansiyondan 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir, 20 dakika beklenip sonuç kontrol edilir. Kitin "C" (kontrol) penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. "T" (test) penceresinde kırmızı şerit meydana gelmiş olması koloninin *E. coli* O157 serotipi olduğunu gösterir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

15.02. Singlepath *E. coli* O157 Kiti ile Hızlı Tayin

Singlepath *E. coli* O157 test kiti kullanarak -katı besiyerinde izolasyon aşamasına gerek kalmadan- 24 saatten kısa bir süre içinde ve "hızlı analiz yaklaşımı ile" gıdada *E. coli* O157:H7 serotipinin varlığının araştırılması çoğu laboratuvarında günlük analiz içinde yer almaktadır.

Kullanılan Malzeme

m TS Broth (Merck 1.09205)

m EC Broth (Merck 1.14582)

Singlepath *E. coli* O157 Test Kiti (Merck 1.04141)

Not: mEC Broth besiyerinin et ürünlerinde, mTS Broth besiyerinin süt ürünlerinde kullanılması önerilmektedir.

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız. Yöntem şematik olarak Ek A 08'de gösterilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan modifiye Tryptic Soy (mTS) Broth ya da modifiye EC (mEC) Broth besiyerinde homojenize edilir. Sıvı gıda bu besiyerlerine eklenir ve 37 °C'da 24 saat inkübe edilir. Her iki besiyeri de novobiosin içermekte olup, otoklav sonrası ayrıca novobiosin ilavesine gerek yoktur. Bu özellik, sadece granül yapısında olan besiyerlerinde vardır.

-Bu süre sonunda besiyerinden cam bir tüpe 1–2 mL kadar alınıp kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına soğutulur.

-Kitin örnek aktarma bölgesine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir, 20 dakika beklenip sonuç kontrol edilir. Kitin "C" (kontrol) penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. "T" (test) penceresinde kırmızı şerit meydana gelmiş olması test edilen kültürde -dolayısıyla test edilen gıdada- *E. coli* O157 serotipi olduğunu gösterir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

15.03. Verotoksin Belirlenmesi

E. coli O157 ya da diğer patojenik *E. coli* serotipleri içinde EHEC olarak gruplandırılanlar en tehlikeli olanlardır. Bunlar VT1 ve VT2 olarak adlandırılan 2 verotoksinden biri ya da her ikisini de üretirler. Serotipin ne olduğunun (örneğin H7 olup olmadığının) belirlenmesi yerine, doğrudan verotoksin oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi halk sağlığı açısından çok daha önemlidir.

Amaç, standart şekilde izole edilmiş tipik koloninin VT1 ve/veya VT2 oluşturup oluşturmadığının belirlenmesidir. Standart şekilde analiz ile elde edilmiş tipik *E. coli* O157 kolonilerine uygulanır. Sadece bir koloni için uygulanabileceği gibi, tipik 4–5 koloni bir arada da incelenebilir. Bu koşulda analiz daha ekonomik şekilde yapılmış olur. Aynı gıda örneğinden gelen 4–5 koloni beraberce analiz yapıldığında sonuç pozitif çıkarsa, analiz edilen gıdada verotoksin pozitif EHEC suşu ya da suşları bulunduğu karar verilir. Tipik bir koloninin VT1 ve/veya VT2 oluşturup oluşturmadığı 7 saatten biraz daha kısa bir süre içinde belirlenir.

Kullanılan Malzeme

CAYE Broth Base (Merck 1.00060)
CAYE Supplement (Carbadox; Merck 1.00051)
Duopath Verotoxins (Merck 1.04144)
Polymyxin B Sulfate (Merck 1.09875)

Analiz

-Yöntem şematik olarak Ek A 09'da gösterilmiştir.

-Standart yöntemle CT-SMAC Agar besiyerinden elde edilen tipik morfolojiye sahip bir ya da birkaç koloni (bakınız; Ek B 15), 1 mL CAYE Broth + CAYE Supplement besiyerinde homojenize edilir ve 37 °C'da 6 saat inkübasyona bırakılır.

-Buradan alınan 180 µL kültür Eppendorf tüpüne aktarılıp, üzerine 20 µL polymyxin çözeltisi ilave edilir (Polymyxin çözeltisi: 5 mg Polymyxin B sulfate 1 mL damıtık suda çözülür). 35–37 °C'da 10 dakika inkübe edilir ve oda sıcaklığına soğutulur. Polimiksin, oluşan verotoksinlerin ortama salgılanmasını sağlar.

-Eppendorf tüpü tüp karıştırıcıda yavaşça karıştırılır ve buradan 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) alınıp, test kitinin örnek gözüne aktarılır. 20 dakika içinde "C" kontrol penceresinde kırmızı şerit görülmelidir. VT1 ve VT2 olarak gösterilen test pencerelerinde kırmızı şerit oluşması test edilen kolonilerden en az birisinde (diğer bir deyiş ile örnekte) sırası ile VT1 ve/veya VT2 üreten bakterinin bulunduğunu gösterir. VT1 ve VT2'nin ayrı pencerelerde izlenmesi bu toksinlerden biri ya da ikisinin oluşturulduğunu gösterir.

-Değerlendirme sonrası, tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

16. Toplam Enterobacteriaceae

16.01. Katı Besiyerinde Sayım	171
16.02. EMS Yöntemi ile Sayım	172
16.03. Canlandırma İşlemi Yapılarak EMS Yöntemi ile Sayım	173

Gıdalarda genel hijyen kontrolü amacıyla toplam Enterobacteriaceae sayımı giderek önem kazanmaktadır. Bu grup, standart olarak katı besiyerinde ve EMS yöntemi ile sayılmaktadır. Son zamanlarda bu grubun öneminin artması nedeni ile, sayımda canlandırma işlemi de uygulanmaktadır.

16.01. Katı Besiyerinde Sayım

ISO 5552, ISO 7402 ve ISO 21528'e uygun olarak Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar besiyerinde standart yayma ya da dökme yöntemiyle ekim ve inkübasyondan sonra bu besiyerinde oluşan tipik kolonilerin sayılarak, toplam Enterobacteriaceae sayısı belirlenir. Bu besiyeri Violet Red Bile Glucose (VRBG) adı ile de bilinir. Yöntemin prensibi, koliform grup bakteri analizinde kullanılan ve laktoz pozitif olan koliform bakterilerin koyu kırmızı koloni oluşturmasını sağlayan VRB(L) Agar besiyerinden laktozun çıkartılıp, bunun yerine glikoz (dekstroz) koyularak, glikozu kullanan tüm Enterobacteriaceae üyelerinin koyu kırmızı koloni vermesini sağlamaktır.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
VRBD Agar (Merck 1.10275)

Analiz

- Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.
- Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.
- Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-İnkübasyon 37 °C'da 24±2 saat süre ile yapılır. VRBD Agar besiyerinde 0,5–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler Enterobacteriaceae familyası üyeleri olarak sayılır. Koloniler VRB Agar'da olduğu gibi görülür (bakınız; Ek B 01).

-*Aeromonas* gibi bazı bakterilerin VRBD Agar besiyerinde Enterobacteriaceae familyası üyeleri gibi sonuç verdiği gözden uzak tutulmamalı, buna bağlı olarak rast gele seçilen 5 koloniye oksidaz testi (Merck 1.13300) uygulanmalıdır. Enterobacteriaceae familyası üyesi bakteriler oksidaz negatiftirler.

-Enterobacteriaceae familyası üyelerinin sayısı standart şekilde hesaplanır ve kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Günlük uygulamada koliform sayımı amacıyla kullanılan VRB Agar (Merck 1.01406) besiyerinde 0,5–2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup olarak sayılıp, 1–2 mm çaplı renksiz kolonilerin sayısı koliform grup bakteri sayısına eklenerek toplam Enterobacteriaceae sayısı hesaplanıyorsa da, bu doğru bir uygulama değildir. Bu uygulama sadece işletme içi hijyen konusunda kabaca bilgi verebilir. Doğrudan Enterobacteriaceae familyası üyesi sayımı gerekli ise VRBD Agar besiyerine ekim yapılması gereklidir.

16.02. EMS Yöntemi ile Sayım

Gıdada düşük sayıda bulunan Enterobacteriaceae familyası üyelerinin sayısı, ISO 7402'ye göre EMS yöntemi ile belirlenir. Bu amaçla, önce Enterobacteriaceae Enrichment Broth besiyerine standart ekim yapılır, inkübasyon sonrasında gelişme olan tüplerden doğrulama amacı ile VRBD Agar besiyerine ekilir. Bu katı besiyerinde inkübasyon sonrasında tipik koloni gelişmesi olursa Petri kutularının ekilmiş olduğu tüpler pozitif olarak işaretlenir ve gıdadaki Enterobacteriaceae sayısı EMS olarak verilir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Enterobacteriaceae Enrichment (EE) Broth (Merck 1.05394)

VRBD Agar (Merck 1.10275)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak EE Broth tüplerine ekim yapılır. Gerekiyorsa EE Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-Tüpler, 35–37 °C'da 24±2 saat inkübe edilir. Bazı standartlarda üreme görülmemesi halinde ilave 24±2 saat daha inkübasyon önerilmektedir.

-İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık görülen her tüpten ayrı ayrı olmak üzere VRBD Agar besiyerine sürme yapılır.

-VRBD Agar besiyerinde 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda 0,5–2 mm çaplı koyu kırmızı koloniler Enterobacteriaceae familyası üyeleri olarak tanımlanır ve bu Petri kutularına ekim yapılmış tüpler pozitif olarak işaretlenir.

-*Aeromonas* gibi bazı bakterilerin VRBD Agar besiyerinde Enterobacteriaceae familyası üyeleri gibi sonuç verdiği gözden uzak tutulmamalı, buna bağlı olarak rast gele seçilen 5 koloniye oksidaz testi (Merck 1.13300) uygulanmalıdır. Enterobacteriaceae familyası üyesi bakteriler oksidaz negatiftirler.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

16.03. Canlandırma İşlemi Yapılarak EMS Yöntemi ile Sayım

Gıdada hasar görmüş ve düşük sayıda bulunan Enterobacteriaceae familyası üyelerinin de belirlenmesi için 3 aşamalı bir analiz uygulanır. Önce Tamponlanmış Peptonlu Su besiyerine EMS yöntemi ile standart ekim yapılır. İkinci aşamada, inkübasyon sonrasında gelişme olan tüplerin her birinden ayrı ayrı olmak üzere Enterobacteriaceae Enrichment Broth besiyerine ekilir. Son aşamada, EE Broth'ta inkübasyon sonrası gelişme olan tüplerden doğrulama amacı ile VRBD Agar besiyerine ekim yapılarak örnekteki Enterobacteriaceae sayısı hesaplanır ve sonuç EMS olarak verilir.

Sırası ile selektif olmayan sıvı besiyerine ekim, buradan selektif sıvı besiyerine inokülasyon ve pozitif tüplerden katı besiyerine ekim olan bu uygulama, oldukça tipik bir örnek olarak bu bölümde verilmiştir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)

Enterobacteriaceae Enrichment (EE) Broth (Merck 1.05394)

VRBD Agar (Merck 1.10275)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız. Yöntem şematik olarak Şekil 17'de (sayfa 119) gösterilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak TPS tüplerine ekim yapılır. Gerekliyse TPS Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-Tüpler, 35–37 °C'da 24±2 saat inkübe edilir. Bazı standartlarda üreme görülmemesi halinde ilave 24±2 saat daha inkübasyon önerilmektedir.

-Bakteri üremesine bağlı bulanıklık görülen bütün tüplerden ayrı ayrı olmak üzere EE Broth tüplerine ekim yapılır ve EE Broth tüpleri 35–37 °C'da 24±2 saat inkübe edilir.

-İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık görülen her tüpten ayrı ayrı olmak üzere VRBD Agar besiyerine sürme yapılır.

-VRBD Agar besiyerinde 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda 0,5–2 mm çaplı koyu kırmızı koloniler Enterobacteriaceae familyası üyeleri olarak tanımlanır ve bu Petri kutularına ekim yapılmış tüpler pozitif olarak işaretlenir.

-*Aeromonas* gibi bazı bakterilerin VRBD Agar besiyerinde Enterobacteriaceae familyası üyeleri gibi sonuç verdiği gözden uzak tutulmamalı, buna bağlı olarak rast gele seçilen 5 koloniye oksidaz testi (Merck 1.13300) uygulanmalıdır (bakınız; 37.03. Bölüm). Enterobacteriaceae familyası üyesi bakteriler oksidaz negatiftirler.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

17. Maya–Küf

17.01. Katı Besiyerinde Sayım	175
17.02. Kserofil Küf Sayımı	176
17.03. Ozmofilik–Ozmotolerant Maya Sayımı; EMS Yöntemi	176
17.04. Ozmofilik–Ozmotolerant Maya Sayımı; IFU Yöntemi	177
17.05. Maya–Küf Aranması	178
17.06. Isıya Dayanıklı Küf Sayılması	179

Gıda işletmelerinde maya küf sayımı genel hijyenik kontrol olarak yapılmaktadır. Bazı uygulamalarda maya ve küf sayısı ayrı ayrı değerlendirilirken, çoğunda maya ve küf sayısı toplam olarak ele alınır. Koloni morfolojilerine göre mayalar ve küfler birbirinden kolaylıkla ayrılır. Basit mikroskopik incelemeler gerekebilir.

17.01. Katı Besiyerinde Sayım

Gıdalardaki maya ve küf sayısı standart analiz yöntemi ile belirlenir. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF) ve ISO (6611) süt ürünlerinin maya ve küf analizinde sırası ile Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar ve Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract (OGYE) Agar kullanılmasını önermektedir. Bu besiyerleri süt ürünleri dışındaki gıda analizlerinde de kullanılır. Diğer besiyerlerinden; RBC Agar maya ve küf sayımı için, DRBC Agar küf sayımı için tercih edilmelidir. Çoğu standart analizde Potato Dextrose Agar besiyeri kullanılır.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar (Merck 1.00467)
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (Merck 1.00466)
Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar (Merck 1.16000)
Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract (OGYE) Agar (Merck 1.05978)
Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 1.10130)

Not 1: Merck YGC, RBC ve DRBC Agar besiyerlerinde katkı yoktur. Diğer bir deyiş ile antibiyotik ana besiyerine ilave edilmiştir. Bu özellik sadece granül besiyerlerinde vardır.

Not 2: Rose Bengal ışığa aşırı duyarlıdır. Dolayısı ile bu bileşeni içeren Rose Bengal Chloramphenicol Agar ve Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar Petri kutularının mutfak tipi alüminyum folyo ile sarılarak depolanması (hatta inkübasyonu) gerekir.

Analiz

- Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.
- Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.
- Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.
- İnkübasyon sonunda (25–28 °C'da 4–5 gün) besiyerinde gelişen bütün koloniler toplam maya–küf olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir. Gerekirse mayalar ve küfler ayrı ayrı sayılabilir (bakınız Ek B 16).
- Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

17.02. Kserofil Küf Sayımı

Makarna, bakliyat, bisküvi, kuruyemiş, kuru meyve, süt tozu vb. kuru gıda maddelerinde bulunan küflerin büyük çoğunluğu kserofil karakterdedir. Bunların sayımı için su aktivitesi A_s 0,95'e düşürülmüş Dichloran Glycerol Agar (DG–18) Agar (Merck 1.00465) besiyeri kullanılmalıdır. Yukarıda 17.01. Bölümde verilen standart maya–küf analizinden tek farkı budur. İnkübasyon sonunda DG–18 Agar'da koloniler kserofil küf olarak sayılır.

17.03. Ozmofilik–Ozmotolerant Maya Sayımı; EMS Yöntemi

Başta meyve suyu konsantreleri ve reçeller olmak üzere, yoğun şeker içeren örneklerde ozmofilik ve ozmotolerant maya sayısı EMS yöntemi ile belirlenir. Bu yöntemde her iki grup maya için tek besiyeri kullanılır. IFU bu iki grup maya için farklı besiyerleri önermektedir (bakınız; 17.04. Bölüm). Ozmofilik–ozmotolerant maya sayımında seyreltme için %20 glikoz çözeltisi kullanılır.

Kullanılan Malzeme

%20 Glikoz Çözeltisi
%50 Glikoz Broth
Su Agar

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve %20 Glikoz Çözeltisi ile homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir. Seyreltmelerde de %20 Glikoz Çözeltisi kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak %50 Glikoz Broth tüplerine ekim yapılır. Tüplerin üzerlerine otoklavda sterilize edilmiş ve 45–50 °C'da tutulan Su Agar çözeltisinden 2'şer mL ilave edilir. Agar çözeltisi besiyeri yüzeyine kendiliğinden çıkar ve jelleşir.

-İnkübasyon sonunda (28 °C'da 5 gün) tüplerin üzerindeki agar tabakasının yukarı itilmiş olması ozmofilik–ozmotolerant mayaların gaz oluşturduğunu gösterir. Bu tüpler pozitif olarak işaretlenir. EMS çizelgesinden yararlanılarak ozmofilik–ozmotolerant maya sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not 1: Bu yöntemde ozmofilik ve ozmotolerant mayalar beraberce sayılır.

Not 2: Tüplere agar ilavesinde agarın erimiş halde olduğuna dikkat edilmelidir. Agar ilave edildiğinde tüpün üst katmanlarına dağılır ancak, daha sonra yukarıda toplanır. Agar ilavesi sırasında pipet kullanılırken agarın pipet içinde donmasını önlemek için, pipet önceden bunzen beki alevinde ısıtılır. İlave edilen agarın hacmi çok önemli değildir, pipet kullanılmadan yaklaşık 1 cm kalınlık yapacak kadar konulması da geçerlidir. Standart 16 mm çaplı tüplerde 2 mL hacim yaklaşık 1 cm kalınlığa eşdeğerdir.

17.04. Ozmofilik–Ozmotolerant Maya Sayımı; IFU Yöntemi

Uluslararası Meyve Suyu Federasyonu (IFU)'ya göre ozmofilik ve ozmotolerant mayalar ayrı besiyerlerinde sayılmaktadır. 17.03. Bölümde bu iki grubun tek besiyerinde EMS yöntemi ile sayımı verilmiştir.

Kullanılan Malzeme

%35 Glikoz Çözeltisi

%50 Glikoz Çözeltisi

Ozmofil Maya Besiyeri

Ozmotolerant Maya Besiyeri

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Meyve suyu konsantresi mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir. Homojenizasyon ve/veya seyreltme yapılması gerekli ise ozmofil maya için %50 Glikoz Çözeltisi, ozmotolerant maya için %35 Glikoz Çözeltisi kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır. Ozmofil maya sayımı ozmofil maya besiyerine, ozmotolerant maya ise ozmotolerant maya besiyerine ekilir.

-İnkübasyon sonunda (28–30 °C'da 5 gün) ilgili besiyerlerinde gelişen maya kolonileri sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: IFU ozmofil ve ozmotolerant mayaların ayrı ayrı sayılmasını önermektedir.

17.05. Maya–Küf Aranması

Pek çok gıdanın belirli bir miktarında maya–küf bulunmaması hedef alınır. Bu amaçla var/yok testi yapılır.

Bu bölümde 10 g (mL) gıda örneğinde maya–küfün var/yok testi ile analizi verilmiştir. 1, 5, 25 g (mL) vb. gibi miktarların analizinde sadece miktar ile orantılı olarak kullanılan besiyeri hacmi değişir. Genel olarak, analiz edilen gıdanın 9 misli sıvı besiyeri kullanılır. Bu miktarlar pek çok ulusal ve uluslararası standartta X g (mL) ve 9X mL olarak gösterilir.

Kullanılan Malzeme

Sabouraud %2 Dextrose Broth (Merck 1.08339)

Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar (Merck 1.16000)

Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract (OGYE) Agar (Merck 1.05978)

Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 1.10130)

Not: Merck YGC Agar besiyerinde katkı yoktur. Bir diğer deyiş ile antibiyotik ana besiyerine ilave edilmiştir. Bu özellik sadece granül besiyerlerinde vardır.

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan Sabouraud %2 Dextrose Broth ile homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanıldığında minimum sıvı hacmi uyarınca -örneğin, 25 g gıda + 225 mL broth kullanılma zorunluluğu varsa- homojenizasyon sonrası 10 gram gıda karşılığı olarak 100 mL homojenizat steril erlene alınır.

-Erlen, sadece maya aranacaksa 28 °C'da 48 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Küf de aranacaksa inkübasyon süresi 4–5 gün olmalıdır. Inkübasyon sıcaklığı ve süresi analiz raporunda belirtilmelidir.

-Sabouraud %2 Dextrose Broth erleninde tipik ya da atipik mikrobiyel gelişme görülürse veya gelişme olup olmadığı belirgin değilse, 9 cm çaplı standart boy Petri kutusuna 1 mL aktarılır, üzerine 10–12 mL kadar agarlı besiyeri dökülür. İstenirse agarlı besiyerine 0,1 mL yayma da yapılabilir.

-Sadece maya aranacaksa 28 °C'da 2 gün inkübasyona bırakılır. Küf de aranacaksa bu süre 4 gündür.

-Sabouraud %2 Dextrose Broth'ta mikrobiyel gelişme yoksa, analiz bitirilir ve analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakteri olmadığına karar verilir. Bazı standartlara göre sıvı besiyerinde gözle görülür bir mikrobiyel gelişme olmasa da agarlı besiyerine inokülasyon yapılmalıdır.

-İnkübasyon sıcaklık ve süreleri ilgili talimat ve analiz raporunda belirtilmelidir.

-Katı besiyerinde maya ve küf kolonilerine rastlanırsa "analiz edilen 10 g (mL) gıdada maya ve küf vardır" şeklinde rapor verilir. Sadece maya kolonisi görülürse "analiz edilen 10 g (mL) gıdada maya vardır", eğer sadece küf kolonisi görülür ise "analiz edilen 10 g (mL) gıdada küf vardır" şeklinde rapor verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Bu yöntem daha çok maya analizi için yapılır.

17.06. Isıya Dayanıklı Küf Sayılması

Isıya dayanıklı küf sporu sayımı ile aynı anlamdadır. Materyal önce vejetatif küf hücrelerinin öldürülmesi için pastörize edilir, daha sonra besiyerine ekildiğinde canlı kalmış olan sporlar çimlenerek koloni oluştururlar.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar (Merck 1.00467)

Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar (Merck 1.16000)

Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract (OGYE) Agar (Merck 1.05978)

Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 1.10130)

Not: Merck YGC ve RBC Agar besiyerlerinde katkı yoktur. Bir diğer deyiş ile antibiyotik ana besiyerine ilave edilmiştir. Bu özellik sadece granül besiyerlerinde vardır.

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Tüp içindeki örnek, kaynar su banyosuna daldırılır, aynı çeper kalınlığındaki tüpte bulunan bir diğer örneğe termometre yerleştirilir.

-Kontrol tüpündeki sıcaklık 80 °C'a eriştiğinde her iki tüp su banyosundan çıkarılır, kontrol tüpünün sıcaklığı kontrol edilerek sıcaklık 79 °C'a düştüğünde tekrar kaynar su banyosuna beraberce daldırılırlar. Bu şekilde 30 dakika tutulduktan sonra test tüpü oda sıcaklığındaki su banyosuna alınır ve soğutulur.

-Gerekli ise seyreltmeler bu aşamada (pastörizasyondan sonra) yapılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-İnkübasyon sonunda (28 °C'da 4–5 gün) agarlı besiyerinde gelişen tüm koloniler toplam ısıya dayanıklı küf olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Günlük ve standart uygulamada pastörizasyon sıcaklığı 80 °C ve süre 30 dakikadır. Literatürde 77 °C'da 30 dakika, 85 °C'da 1 dakika gibi uygulamalara da rastlanılmaktadır. Pastörizasyon parametreleri ilgili talimata ve analiz raporuna yazılmalıdır.

18. *Staphylococcus aureus*

18.01. Katı Besiyerinde Sayım	181
18.02. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz	182
18.03. EMS Yöntemi ile Sayım	183
18.04. Var/yok Testi	185

S. aureus patojen bir bakteridir ve intoksikasyon tipi gıda zehirlenmelerine neden olur. İşlem görmüş gıdalarda bulunmasına izin verilmez ancak, çiğ et gibi gıdalarda az sayıda bulunmasına izin verilebilir. Buna göre arama ya da sayma yöntemi kullanılır. Gıdadaki varlığı her zaman zehirlenme yapacağı anlamına gelmez. Toksin oluşturması gıdanın asitliği, kuru maddesi vb. faktörlere bağlıdır.

Not 1: *S. aureus* analizinde kullanılan Giolitti–Cantoni Broth besiyerine ilave edilen potasyum tellurit çözeltisi zehirlidir. Hazırlanması çeker ocak altında, tüplere ve erlenlere ilavesi otomatik pipet ya da puarlı pipet ile yapılmalıdır.

Not 2: *S. aureus* analizinde kullanılan Giolitti–Cantoni Broth besiyerine potasyum tellurit çözeltisi eklendikten sonra besiyeri aynı gün kullanılmalıdır.

18.01. Katı Besiyerinde Sayım

ISO 6888'e göre gıdalarda *S. aureus* sayısı katı besiyerinde standart kültürel yöntemle belirlenir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
Baird–Parker Agar Base (Merck 1.05406)
Egg–yolk Tellurit (Merck 1.03785)
Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Baird–Parker Agar bazal besiyerine yumurta sarısı–tellurit emülsiyonu ilavesi 45–50 °C sıcaklıkta yapılır. Bu emülsiyon, önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır. Yayma yönteminde sıvı gıda örneğinden ya da 10⁻¹ seyreltiden 1 mL alınıp standart boy 3 Petri kutusuna eşit olarak dağıtılır. 14 cm çaplı Petri kutusu kullanılıyorsa 1 mL örnek ya da homojenizat Petri kutusuna aktarılır. Standart gıda analizinde daha fazla seyreltmeye gerek yoktur. Ekimden sonra Petri kutusu 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.

-Baird–Parker Agar besiyerinde etrafı saydam zonlu 1–1,5 mm çaplı siyah parlak koloniler (bakınız; Ek B 17) *S. aureus* olarak sayılır ve örnekteki sayı standart yöntemle hesaplanır. Bu besiyerinde zonsuz, 0,5–1,5 mm çapındaki siyah ve parlak koloniler mikrokok olarak değerlendirilir.

-Gerekliyse, tipik ya da şüpheli kolonilere Bactident Coagulase kullanılarak koagülaz testi yapılır (bakınız; 37.14. Bölüm).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

18.02. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz

Kullanılan Malzeme ve Katkıları

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Baird–Parker Agar Base (Merck 1.05406)

Egg–yolk tellurit (Merck 1.03785)

Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

Not: Membran filtrasyon üreticisi firmalar tarafından ped üzerine emdirilerek hazırlanmış besiyerleri üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılır.

Analiz

-Öncelikle "07.03. Membran Filtrasyon" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon gerekli ise Maximum Recovery Diluent kullanılır. Yağsız süt ürünleri -ön filtrasyon koşuluyla- ¼ Ringer çözeltisi ile homojenize edilir.

-Örnek, membran filtrasyondan geçirilir ve filtre Petri kutusunda hazırlanmış Baird–Parker Agar üzerine yerleştirilir. Bu amaçla standart 9 cm ya da filtreye uygun olmak üzere 6 cm çaplı Petri kutuları kullanılır.

-Petri kutusu -kapağı üste gelecek şekilde (tabanı üzerine)- 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.

-Baird–Parker Agar besiyerinde etrafı saydam zonlu 1–1,5 mm çaplı siyah parlak koloniler (bakınız; Ek B 17) *S. aureus* olarak sayılır ve örnekteki sayı standart yöntemle hesaplanır. Bu besiyerinde zonsuz, 0,5–1,5 mm çapındaki siyah ve parlak koloniler mikrokok olarak değerlendirilir.

-Gerekliyse, tipik ya da şüpheli kolonilere Bactident Coagulase kullanılarak koagülaz testi yapılır (bakınız; 37.14. Bölüm).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

18.03. EMS Yöntemi ile Sayım

S. aureus için selektif olan Giolitti–Cantoni Broth besiyerinde standart EMS yöntemi ile ekim yapılır, inkübasyondan sonra siyahlaşma görülen tüplerden Baird–Parker Agar besiyerine sürme yapılır. Bu besiyerinde tipik koloniler görülür ve bunlar *S. aureus* olarak doğrulanırsa o Petri kutusuna ekimin yapıldığı tüp pozitif olarak değerlendirilir ve standart EMS çizelgesi ile gıdadaki *S. aureus* sayısı hesaplanır (ISO 6883).

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

Giolitti–Cantoni Broth Base (Merck 1.10675)

Potasyum tellurit trihidrat çözeltisi (Merck 1.05164)

Sıvı parafin (Merck 1.07160)

Su Agar

Baird–Parker Agar Base (Merck 1.05406)

Egg–yolk tellurit (Merck 1.03785)

Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak Giolitti–Cantoni Broth tüplerine ekilir. Bu besiyeri 18 X 180 mm boyutlarında büyük tüplerde 19 mL olarak hazırlanır. Ekim öncesi, tüplere filtre ile sterilize edilmiş %1 potasyum tellurit trihidrat çözeltisinden 0,1'er mL ilave edilir. Besiyerinin 19 mL olarak hazırlanması IDF tarafından gösterilmekte iken, ISO 6883'e göre Giolitti–Cantoni Broth tüplere 10'ar mL olarak dağıtılmaktadır. Yine ISO ilk 3 tüpün gerekirse çift kuvvette hazırlanabileceğini belirtmektedir (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-Ekimden sonra tüplere steril sıvı parafinden 2 mL ilave edilir ve tüpler 37 °C'da 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır. ISO 6883'e göre bu tüplere 1 cm tabaka oluşturacak şekilde steril %2 konsantrasyonlu Su Agar çözeltisi ilave edilir.

-Siyahlaşma görülen her tüpten (bakınız; Ek B 18) 9 cm çaplı standart boy Petri kutularında hazırlanmış Baird–Parker Agar besiyerine öze ile sürme yapılır. ISO 6883'e göre agar tabakası kontaminasyona neden olmayacak şekilde spatülle çıkartılır, tüp boğazında kalan agar parçalarının dibe çökmesi için tüp karıştırıcıda karıştırılır.

-Bazı standartlarda sadece siyahlaşma olan tüpler muhtemel *S. aureus* olarak değerlendirilip bu tüplerden Baird–Parker Agar'a ekim yapılırken, diğerlerinde siyahlaşma olsun ya da olmasın tüm tüpler agara ekilir.

-Baird–Parker Agar bazal besiyerine yumurta sarısı–tellurit emülsiyonu ilavesi 45–50 °C sıcaklıkta yapılır. Bu emülsiyon, önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.

-İnkübasyondan sonra (37 °C'da 24 saat) Baird–Parker Agar besiyerinde etrafı saydam zonlu 1–1,5 mm çaplı siyah parlak koloniler (bakınız; Ek B 17) *Staph. aureus* olarak değerlendirilir ve pozitif sonuç alınan Petri kutularının ekilmiş olduğu tüpler pozitif olarak işaretlenir. EMS çizelgesinden yararlanılarak *Staph. aureus* sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Gerekliyse, tipik ya da şüpheli kolonilere Bactident Coagulase kullanılarak koagülaz testi yapılır (bakınız; 37.14. Bölüm).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

18.04. Var/yok Testi

Not: Bu metinde 10 g (mL) gıdada var/yok testi ile *S. aureus* aranma yöntemi verilmiştir. 1, 5, 25 g (mL) gıdada aranmasında prensip aynıdır. Gıda miktarının 9 misli besiyeri kullanılır. Katkının buna göre değişen miktarlarda kullanılacağına dikkat edilmelidir.

Kullanılan Malzeme

Giolitti–Cantoni Broth Base (Merck 1.10675)
Potasyum tellurit trihidrat çözeltisi (Merck 1.05164)
Sıvı parafin (Merck 1.07160)
Baird–Parker Agar Base (Merck 1.05406)
Egg–yolk tellurit (Merck 1.03785)
Brain Heart Broth (Merck 1.10493)
Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. 10 gram katı gıda tartılır ve 90 mL Giolitti–Cantoni Broth içinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanıldığında minimum sıvı hacmi uyarınca -örneğin, 25 g gıda + 225 mL broth kullanılma zorunluluğu varsa- homojenizasyon sonrası 10 gram gıda karşılığı olarak 100 mL homojenizat steril erlene alınır. 90 mL Giolitti–Cantoni Broth besiyerine, gıda eklenmeden hemen önce filtre ile sterilize edilmiş %1 potasyum tellurit trihidrat çözeltisinden 0,5 mL ilave edilir. 225 mL Giolitti–Cantoni Broth için bu miktar 1,20 mL'dir.

-Ekimden sonra erlene 1,5–2 cm kalınlık olacak şekilde sıvı parafin ilave edilir ve tüpler 37 °C'da 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

-Giolitti–Cantoni Broth'ta gelişme ve siyahlaşma yoksa, analiz bitirilir ve analiz edilen 10 g (mL) gıdada *S. aureus* olmadığına karar verilir. Bazı standartlara göre brothta gözle görülür bir mikrobiyel gelişme olmasa da Baird–Parker Agar besiyerine öze ile sürme yapılır ve 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.

-Baird–Parker Agar besiyerinde etrafı saydam zonlu 1–1,5 mm çaplı siyah parlak koloniler (bakınız; Ek B 17) *S. aureus* olarak değerlendirilir ve sonuç 10 g (mL) gıdada *S. aureus* var, aksi halde 10 g (mL) gıdada *S. aureus* yok olarak verilir.

-Gerekliyorsa, tipik ya da şüpheli kolonilere Bactident Coagulase kullanılarak koagülaz testi yapılır (bakınız; 36.17. Bölüm).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

MERCK *Salmonella* Besiyerleri

Bismuth Sulfite Agar acc. to WILSON-BLAIR	1.05418	500 g
BPL Agar (Brilliant-green Phenol-red Lactose Agar)	1.07236	500 g
BPLS (Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose) Agar	1.07237	500 g
BPLS (Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose) Agar	1.07232	500 g
BPLS Agar, modified	1.10747	500 g
BROLAC Agar (Bromothymol-blue Lactose Agar)	1.01639	500 g
BROLACIN Bromothymol-blue Lactose Cystine) Agar	1.01638	500 g
DCLS (Deoxycholate Citrate Lactose Sucrose) Agar	1.10270	500 g
DHL Agar acc. to SAKAZAKI	1.11435	500 g
EMB Agar (Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar)	1.01347	500 g
HEKTOEN Enteric Agar	1.11681	500 g
KLIGLER Agar (Double sugar iron agar acc. to KLIGLER)	1.03913	500 g
Lactose Broth	1.07661	500 g
LEIFSON Agar, modified	1.02896	500 g
M-(Mannose) Broth	1.10658	500 g
MacCONKEY Agar	1.05465	500 g
Malachite-green Broth, Base	1.10329	500 g
MSRV Medium Base, modified	1.09878	500 g
MSRV Selective Supplement	1.09874	16 vial
Peptone Water (Buffered)	1.07228	500 g
Phenol-red Broth Base	1.10987	500 g
RAMBACH® Agar (4x250 mL)	1.07500	1kutu
RVS Broth	1.07700	500 g
Salmosyst® Broth Base	1.10153	500 g
Salmosyst® Selective Supplement (250 tablet)	1.10141	1kutu
Selenite Cystine Broth	1.07709	500 g
Selenite Enrichment Broth acc. to LEIFSON	1.07717	500 g
SS Agar (Salmonella Shigella Agar)	1.07667	500 g
Tetrathionate Broth Base acc. to MULLER-KAUFFMANN	1.10863	500 g
Tetrathionate Crystal-violet Enrichment Broth (PREUSS)	1.05173	500 g
XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) Agar	1.05287	500 g
XLT4 Agar, Base	1.13919	500 g

19. *Salmonella* Aranması

19.01. Var/yok Testi	187
19.02. <i>Salmonella</i> Tanımlanması	189
19.03. Klasik Kültürel Yöntemlerle Hızlı Analizler	190
19.03.01. Salmosyst Sistemi	190
19.03.02. Yarı Katı Besiyeri Kullanılarak Hızlı Analiz	191
19.04. Singlepath <i>Salmonella</i> ile Hızlı Analiz Yöntemi	192

Salmonella analizinde var/yok testi esaslı olmak üzere besiyeri farklılıklarına dayalı pek çok analiz yöntemi bulunmaktadır. Hiçbir gıdanın 25 g (mL) örneğinde *Salmonella* bulunmasına izin verilmez. Aslında, yaklaşık 2500 *Salmonella* serotipinden insanlarda patojen olan sayısı sadece 50 kadardır. Buna göre 25 gram gıdada *Salmonella* aranıp, pozitif sonuç alınıyorsa bunun serotipinin belirlenmesi, eğer patojen ise gıdanın reddedilmesi, patojen değilse bu kez EMS yöntemi ile değerlendirilip sayının fekal kontaminasyon olarak *E. coli* gibi değerlendirilmesi gerekir ise de, bu analizler standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında gerçekleştirilemeyecek kadar karmaşık ve pahalıdır. Bu nedenle gıdalarda serotipe bakılmaksızın *Salmonella* aranır.

Salmonella, yeryüzünde en yaygın patojenlerden biri olma ve oldukça eskiden beri bilinme gibi nedenlerle üzerinde en çok çalışılmış mikroorganizmalardan birisidir. *Listeria monocytogenes* ile birlikte -kayıtlara geçmiş- ölüme en fazla neden olan gıda kaynaklı patojenlerdir. Buna bağlı olarak, izolasyonu için gerek ön zenginleştirme gerek selektif zenginleştirme aşamalarında çok sayıda besiyeri ile inkübasyon sıcaklığı ve süresi önerilmiştir. Bu bölümde bunlardan en yaygın olarak kullanılanlar verilmiştir.

19.01. Var/yok Testi

25 g (mL) gıda örneğinde *Salmonella*, selektif olmayan besiyerinde ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif katı besiyerine sürme ve tipik kolonilerin biyokimyasal testlerle doğrulanması olan standart var/yok yöntemiyle analiz edilir. *Salmonella* analizinde ISO (6579) selektif olmayan ön zenginleştirme için Tamponlanmış Peptonlu Su, selektif zenginleştirme için Rappaport Vassiliadis Soy Broth ile Selenite Cystine Broth, selektif katı besiyeri olarak Brilliant Green Fenol Red Agar ile analizi yapan laboratuvar tarafından karar verilecek ikinci bir selektif agar kullanılmasını önermektedir. Ürün çeşidine göre ön zenginleştirme besiyerinde çeşitli modifikasyonlar yapılabilmektedir. Örneğin, %20'den fazla kakao içeren gıdalar, Gram pozitif bakteriler ile yoğun olarak kirlenmiş gıdalar, gum içeren gıdalar vb. için özel ön zenginleştirme uygulaması vardır.

Bu gibi gıdalarda ön zenginleştirme besiyerine çeşitli maddeler eklenebilmekte ve/veya gıda maddesi standart 1:9 (25 mL gıda + 225 mL ön zenginleştirme besiyeri) 1:20, 1:50 hatta 1:100 oranlarında analize alınmaktadır. Bu konuda ilgili ürün standardına baş vurulmalıdır. Bu bölümde standart gıda analizi verilmiştir.

Kullanılan Malzeme

Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)
Rappaport Vassiliadis Soy Broth (Merck 1.07700)
Selenite Cystine Broth (Merck 1.07709)
Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar (Merck 1.10747)
Rambach Agar (Merck 1.07500)
XLT4 Agar (Merck 1.13919)
XLT4 Supplement (Merck 1.08981)
Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck 1.05287)
Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)
Urea Broth (Merck 1.08483)
Lysine Iron Agar (Merck 1.11640)
Singlepath Salmonella (Merck 1.04140)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız. Yöntem şematik olarak Ek A 10'da gösterilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa 25 gram katı gıda 225 mL Tamponlanmış Peptonlu Su besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir.

-Erlen, 35–37 °C'da 16–20 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

-İnkübasyondan sonra Selenit Sistin ve RVS Broth selektif zenginleştirme besiyerlerine ekim yapılır. Selektif zenginleştirmede 10 mL RVS Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 0,1 mL eklenir ve inkübasyon 42–43 °C'da 24 saat olarak yapılır. Selenit Sistin kullanımında ise 100 mL besiyerine 10 mL ön zenginleştirme kültürü ilave edilir ve inkübasyon 37 °C'da 24 saat olarak yapılır. Selenit Sistin besiyerinde inkübasyon 42–43 °C'da da yapılabilir, ancak bu sıcaklık seçilirse analiz raporuna yazılmalıdır. İnkübasyondan sonra 2 selektif katı besiyerine sürme yapılır. ISO 6579 selektif katı besiyeri olarak Brilliant Green Fenol Red Agar ile araştırma laboratuvarının tercihine bırakılan başka bir selektif katı besiyeri kullanımını önermektedir.

-Rambach Agar, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar ve özellikle XLT4 Agar son zamanlarda tercih edilmektedir. 37 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra tipik koloniler varsa, bunlardan 5 adedi ayrı ayrı olmak üzere Triple Sugar Iron (TSI) Agar, Urea Broth ve Lysine Iron Agar besiyerinde tanımlanır. İlave biyokimyasal testler yapılması da önerilmektedir. Çalışma serolojik esaslı testler ile bitirilir. Singlepath Salmonella bu amaçla kullanılmaktadır.

-Tipik koloni morfolojileri ve yapılması gereken temel biyokimyasal testler 19.02. Bölümde verilmiştir.

-Selektif katı besiyerlerinden herhangi birisinden izole edilen tipik kolonilerden 1 adedi dahi *Salmonella* olarak tanımlanırsa "analiz edilen 25 g (mL) gıdada *Salmonella*" vardır şeklinde rapor verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

19.02. *Salmonella* Tanımlanması

Salmonella, Brilliant Green Phenol Red Agar'da etrafı parlak kırmızı bir zon ile çevrili pembe-kırmızı renkli (bakınız; Ek B 19), Rambach Agar'da kırmızı (bakınız; Ek B 20), XLD Agar'da besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli (bakınız; Ek B 21) ve XLT4 Agar'da siyah renkli (bakınız; Ek B 22), MSRV Medium'da opak haleli ve yayılıcı (bakınız; Ek B 23), Diasalm Medium'da menekşe renkli bir zon ve yayılıcı (bakınız; Ek B 24) koloni oluşturur.

Salmonella basit olarak TSI Agar besiyerindeki reaksiyonları ile tanınır. Şüpheli koloni 0,5–1 mL steril suda çözülüp, Triple Sugar Iron Agar besiyerinin yüzeyine aşı özesi ile sürme ve dibe aşı iğnesi ile daldırma yapılır. 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda besiyerinin dip kısmının sarı (glikozun kullanımı) ve siyah olması (hidrojen sülfür oluşumu), yüzeyin kırmızı olması (laktoz ve sakkarozun kullanılmaması), besiyerinde gaz delikleri ve/veya yarıkları oluşması ve/veya besiyerinin dip kısmından yukarı doğru itilmesi (glikozdan gaz oluşması) *Salmonella* 'yı doğrular. Bazı hallerde siyah renk dipteki sarılığı örtecek kadar baskın olabilir. Bu durumda da kültür *Salmonella* pozitif olarak değerlendirilir. *Salmonella* genel olarak glikoz pozitif, glikozdan gaz oluşturma pozitif, laktoz negatif, sakkaroz negatif ve hidrojen sülfür pozitif bir bakteridir.

Salmonella analizinde, *Proteus* koloni morfolojisinin *Salmonella* kolonisine benzemesi, çoğu zaman sahte pozitif sonuçlara neden olmaktadır. *Proteus* kolonileri TSI Agar besiyerinde de *Salmonella* gibi reaksiyon vermektedir. Bu iki bakterinin kesin ayrımı üre testi ile yapılmaktadır. *Salmonella* üre negatif, *Proteus* üre pozitifdir.

Bu test için tipik *Salmonella* morfolojisindeki kültür, tercihen filtre ile sterilize edilmiş Urea Broth besiyerine inoküle edilir. 37 °C'da 48 saate kadar süren inkübasyon sonunda, besiyerinin orijinal portakal kırmızısı renginin sarıya dönüşmesi negatif (*Salmonella*), kırmızıya dönüşmesi (*Proteus*) pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Üre testi yapılırken 4 adet Urea Broth besiyeri hazırlanması, bunlardan birincisine bakteri aşılanmadan orijinal portakal kırmızısı rengin izlenmesi (şahit), ikincisine şüpheli kültür (test), üçüncüsüne üre negatif olan *E. coli* (negatif sonuç) ve dördüncüsüne üre pozitif olan *Proteus* spp. inoküle edilmesi (pozitif sonuç), bu 4 tüpün beraber inkübasyonu ve renk değerlendirilmesi gerekir.

Lisin testi için şüpheli koloni 0,5–1 mL steril suda çözülüp, Lysine Iron Agar besiyerinin yüzeyine aşı özesi ile sürme ve dibe aşı iğnesi ile daldırma yapılır. 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda besiyerinin dip kısmı ve yüzeyin menekşe renkli olması *Salmonella* için tipik reaksiyonlardır. Dipte siyah renk olması hidrojen sülfür oluşumunu gösterir ve bu da *Salmonella* için tipik bir reaksiyondur. Bazı hallerde siyah renk dipteki menekşe rengi örtecek kadar baskın olabilir. Bu durumda da kültür *Salmonella* pozitif olarak değerlendirilir. *Salmonella* lisin ve hidrojen sülfür pozitif bir bakteridir.

19.03. Klasik Kültürel Yöntemlerle Hızlı Analizler

Standart olarak *Salmonella* analizinin 4 gün sürmesi nedeni ile hızlı analiz yöntemleri geliştirilmektedir. Hızlı analizler Salmosyst sisteminde olduğu gibi ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme toplam süresini azaltmak ya da MSRV Medium ve Diasalm Medium yarı katı besiyerlerinde olduğu gibi selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyeri ekim aşamalarını birleştirmek şeklindedir.

19.03.01. Salmosyst Sistemi

Salmosyst besiyerleri ile ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme süresi toplam 30 saattir. Böylece analiz 18 saat kısalmış olur.

Kullanılan Malzeme

Salmosyst Broth (Merck 1.10153)
Salmosyst Selective Supplement (Merck 1.10141)
Rambach Agar (Merck 1.07500)
Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)
Urea Broth (Merck 1.08483)
Lysine Iron Agar (Merck 1.11640)
Singlepath Salmonella (Merck 1.04140)

Analiz

-Hızlandırılmış analizde gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. 25 gram tartılır ya da sıvı gıda ise 25 mL alınır. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa katı gıda 225 mL Salmosyst Broth besiyeri içinde homojenize edilir. 37 °C'da 8 saat inkübe edilir, steril bir tüpe 10 mL alınıp, üzerine 1 adet Salmosyst Selective Supplement tableti atılır. 30 dakika kendi halinde bırakılır, bu sürenin bitiminde mekanik tüp karıştırıcı ile kuvvetlice karıştırılır ve 37 °C'da 22 saat inkübasyona bırakılır. Selektif zenginleştirme aşamasından sonraki diğer işlemler yukarıda 19.01. Bölümde verildiği şekilde devam eder. Salmosyst sisteminde selektif besiyeri olarak Rambach Agar kullanıldığında daha iyi sonuç alındığı belirtilmektedir.

19.03.02. Yarı Katı Besiyeri Kullanılarak Hızlı Analiz

25 g (mL) gıdada *Salmonella*, selektif olmayan besiyerinde ön zenginleştirmeden sonra selektif zenginleştirme aşaması atlanarak, doğrudan yarı katı selektif katı besiyerine aktarılması ve tipik kolonilerin biyokimyasal testlerle doğrulanması olan standart var/yok yöntemiyle analiz edilir. Bu sistemde selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine sürme işlemleri birleştirildiği için analiz süresinde 24 saatlik bir azalma sağlanır. Hareketsiz serotiplerin bu yöntemle belirlenemeyeceği unutulmamalıdır.

Kullanılan Malzeme

Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)
MSRV Medium (Merck 1.09878)
MSRV Supplement (Merck 1.09874)
Diasalm Medium (Merck 1.09803)
Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)
Urea Broth (Merck 1.08483)
Lysine Iron Agar (Merck 1.11640)
Singlepath Salmonella (Merck 1.04140)

Analiz

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. 25 gram tartılır ya da sıvı gıda ise 25 mL alınır. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa katı gıda 225 mL Tamponlanmış Peptonlu Su besiyeri içinde homojenize edilir ve 37 °C'da 18 saat inkübasyona bırakılır.

-Bu sürenin sonunda Diasalm ve/veya MSRV besiyerlerine 3 ayrı noktaya Pastör pipeti ile 1'er damla ön zenginleştirme kültürü damlatılır. Her 2 besiyeri de yumuşak agar olduğu için Petri kutuları tabanları üzerine 42 °C'da 24 saat süre ile inkübe edilir. Bu aşamadan sonraki diğer işlemler yukarıda 19.01. Bölümde verildiği şekilde devam eder.

19.04. Singlepath Salmonella ile Hızlı Analiz Yöntemi

Kullanılan Malzeme

Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)
Rappaport Vassiliadis Soy Broth (Merck 1.07700)
Singlepath Salmonella (Merck 1.04140)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız. Yöntem şematik olarak Ek A 11'de gösterilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan Tamponlanmış Peptonlu Su besiyerinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir. 37 °C'da 24 saat inkübe edilir.

-Bu kültürden 10 mL RVS Broth besiyerine 0,1 mL aktarılıp, 41,5 °C'da 24 saat inkübasyon yapılır. Inkübasyon bitiminde bu kültürden cam bir tüpe 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) Singlepath Salmonella kitine uygulanır. 20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde, dolayısı ile gıdada *Salmonella* olduğunu gösterir. Pozitif sonuç alındığında doğrulama için standart bir katı besiyerine sürme yapıp sonucun doğrulanması önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuç alınırsa analize devam etmenin gereği yoktur. Bu yöntemde toplam analiz süresi 42 saat 35 dakikadır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

20. *Listeria monocytogenes*

20.01. Var/yok Testi; ISO 11290 Yöntemi	193
20.02. <i>Listeria monocytogenes</i> Tanımlanması	195
20.03. Var/yok Testi; FDA Yöntemi	196
20.04. Var/yok Testi; IDF Yöntemi	197
20.05. Singlepath <i>Listeria</i> ile Hızlı Analiz	198

Patojen bir bakteri olan *Listeria monocytogenes* 'in 25 g (mL) gıdada bulunmasına izin verilmez. Temel analiz metodu var/yok testi ile kontroldür. Çeşitli standartlarda farklı besiyerleri kullanılır. Ancak tümünün ilkesi 1 ya da 2 aşamalı selektif zenginleştirme, selektif agara sürme ve tipik kolonilerin tanımlanmasıdır. *Listeria monocytogenes* hızlı yöntemlerle de belirlenebilmektedir.

Not: *Listeria monocytogenes* gebelerde düşük yapmaya neden olabilir. Bu nedenle gebe ya da gebelik kuşkusu olanların *L. monocytogenes* analizine katılmaması gerektiği uluslararası kontrol kuruluşları tarafından uyarılmaktadır. *Salmonella* spp. ile birlikte -kayıtlara geçmiş- ölüme en fazla neden olan gıda kaynaklı patojendir.

20.01. Var/yok Testi; ISO 11290 Yöntemi

Not: ISO 11290 revize edilmektedir. Buna göre selektif katı besiyeri olarak ALOA Agar ile kullanıcının tercihinin bırakılan bir başka katı besiyeri kullanımı gündemdedir. Burada standardın mevcut durumu ile analiz yöntemi verilmektedir.

Kullanılan Malzeme ve Katkıları

Fraser Broth Base (Merck 1.10398)
Fraser Broth Supplement (Merck 1.10399)
PALCAM Agar (Merck 1.11755)
PALCAM Agar Selective Supplement (Merck 1.12122)
Oxford Agar (Merck 1.07004)
Oxford Agar Selective Supplement (Merck 1.07006)
Tryptone Soya Yeast Extract (TSYE) Agar
Phenol Red Broth Base (Merck 1.10987)
Rhamnose (Merck 1.04736)
Xylose (Merck 1.08689)
Kanlı Agar
Staphylococcus aureus
Rhodococcus equi

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız. Yöntem Ek A 12'de şematik olarak gösterilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa 25 gram katı gıda 225 mL 1/2 (yarım kuvvette) Fraser Broth besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir. Fraser Broth'un yarım konsantrasyonda ilave edilecek olan katkıları, amaca göre homojenizasyon öncesinde ya da sonrasında ilave edilebilir. Gıdada hasar görmüş *Listeria* olmasından kuşku duyuluyorsa 30 °C'da 4 saat inkübasyona bırakılması ve sonra selektif katkı ilave edilmesi önerilir.

-30 °C'da toplam 24 saat inkübasyondan sonra Oxford ve/veya PALCAM Agar besiyerine sürme yapılır, paralel olarak bu ön zenginleştirme kültüründen selektif katkıları tam konsantrasyonda ilave edilmiş 10 mL Fraser Broth'a 0,1 mL ilave edilir. Bu besiyeri 35–37 °C'da 48 saat inkübe edilir. Inkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde Oxford ve/veya PALCAM Agar besiyerine sürme yapılır.

-Bütün Oxford ve/veya PALCAM Agar besiyerleri 30–37 °C'da 24, gerekirse 48 saat inkübe edilir. Inkübasyon sıcaklığı analiz raporuna kaydedilir.

-Şüpheli koloniler TSYE Agar besiyerine ayrı ayrı sürülür. 30–37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda bu besiyerinde oluşan koloniler tanımlanır.

-Tipik koloni morfolojileri ve yapılması gereken temel biyokimyasal testler 20.02. Bölümde verilmiştir.

-Hangi aşamadan gelirse gelsin, *Listeria monocytogenes* belirlenirse analiz raporu "25 g (mL) gıdada *Listeria monocytogenes* vardır" şeklinde, hangi aşamadan gelirse gelsin, *Listeria* spp. belirlenir ancak bunun *L. monocytogenes* olmadığı saptanırsa analiz raporu "25 g (mL) gıdada *L. monocytogenes* yoktur ancak, *Listeria* spp. vardır" şeklinde, her 3 aşamada da *Listeria* türüne rastlanmaz ise analiz raporu "25 g (mL) gıdada *Listeria* yoktur" şeklinde yazılır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not 1: *Listeria* analizinde Fraser Broth bazal besiyerine ilave edilen katkılar yarım ve tam kuvvette olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda ilave edilir (bakınız; 50.01. Bölüm). Fraser Broth katkılarının en ekonomik kullanımı için 4 gıda paralel olarak analiz edilir. Bu amaçla 4 adet 225 mL ile 4 adet 10 mL Fraser Broth hazırlanır. Bu konuda 50.02. Bölümde açıklayıcı bilgi verilmiştir.

Not 2: Fraser Broth, katkı ilave edildiği gün kullanılmalıdır. Buna göre birinci gün erlenlere katkı ilavesinden sonra selektif katkı olan şişe (vial) dondurulur, amonyum demir (III) sitrat buzdolabında saklanır.

20.02. *Listeria monocytogenes* Tanımlanması

Listeria türleri, PALCAM Agar'da 1,5–2 mm çapında zeytin yeşili–gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu (bakınız; Ek B 25), Oxford Agar'da ise 2–3 mm çapında siyahımsı yeşil kahverengi, siyah zonlu çökük merkezli (bakınız; Ek B 26) koloni oluşturur.

Selektif katı besiyerlerinden izole edilen ve TSYE Agar besiyerine sürülen koloniler biyokimyasal testler ile tanımlanır. Bu amaçla uygulanan testler ramnoz ve ksiloz kullanımı ile hemoliz ve CAMP testleridir. Şeker testleri Phenol Red Broth Base besiyerinde, hemoliz ve CAMP testi ise Kanlı Agar'da yapılır.

Şekerler, Phenol Red Broth Base (Merck 1.10987) besiyerine filtre edilerek ilave edilir. Şüpheli koloniden 1 öze alınarak besiyerine inoküle edilir ve inkübasyon 37 °C'da 24 saat olarak yapılır. Bu süre sonunda besiyeri renginin pembeden sarıya dönmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir (bakınız; 37.07. Bölüm).

Kanlı Agar besiyerine sürme işleminden sonra inkübasyon 37 °C'da 24 saat olarak yapılır. Bu süre sonunda gelişen kolonilerin etrafında berrak zonlar görülmesi β hemoliz pozitif olarak değerlendirilir (bakınız; 37.13. Bölüm).

Kanlı Agar besiyerine 2 uca *S. aureus* (CAMP testi için zayıf hemoliz veren tipi) ve *R. equi* sürülür. Analiz edilecek bakteriler bunlara dik olarak ancak, *S. aureus* ve *R. equi* 'ye değmeyecek şekilde ve birbirlerine paralel olarak sürülür. İnkübasyon 37 °C'da 24 saat olarak yapılır. Bu süre sonunda *S. aureus* ve *R. equi* tarafında hemolizin artması pozitif olarak değerlendirilir. Eğer amaç sadece *Listeria monocytogenes* varlığını belirlemek ise, *R. equi* kullanılmayabilir.

Bu durumda ortaya sadece *S. aureus* ve buna dik olarak *L. monocytogenes* olup olmadığı kontrol edilecek izolatlar sürülür. *Listeria* türlerinin biyokimyasal test sonuçları aşağıda verilmiştir.

Çizelge 10. *Listeria* Türlerinin Ayrımı

Tür	Ramnoz	Ksiloz	β hemoliz	CAMP S.A.	CAMP R.E.
<i>L. monocytogenes</i>	+	–	+	+	–*
<i>L. innocua</i>	v	–	–	–	–
<i>L. ivanovii</i>	–	+	+	–	+
<i>L. seeligeri</i>	–	+	+	+	–
<i>L. welshimeri</i>	v	+	–	–	–
<i>L. grayi</i>	–	–	–	–	–

*Nadiren pozitif sonuç alınmaktadır. V: değişken; S.A. *S. aureus*; R.E. *R. equi*

20.03. Var/yok Testi; FDA Yöntemi

Listeria monocytogenes, farklı kuruluşlar tarafından farklı besiyerleri kullanılarak analiz edilmektedir. FDA yönteminde tek aşamalı zenginleştirme vardır.

Listeria Enrichment Broth bazal besiyeri FDA ve IDF yöntemlerinde farklıdır. Ancak her iki besiyerinde de aynı katkı kullanılır. Daha önce kullanılmakta olan Listeria Enrichment Broth acc. to FDA (Merck 1.10549), FDA'nın bileşim değişimi ile Buffered Listeria Enrichment Broth (Merck 1.09628) olarak kullanılmaktadır.

Kullanılan Malzeme

Buffered Listeria Enrichment Broth (LEB) acc. to FDA (Merck 1.09628)
Listeria Selective Enrichment Supplement acc. to FDA&IDF (Merck 1.11781)
PALCAM Agar (Merck 1.11755)
PALCAM Agar Selective Supplement (Merck 1.12122)
Oxford Agar (Merck 1.07004)
Oxford Agar Selective Supplement (Merck 1.07006)
Tryptone Soya Yeast Extract (TSYE) Agar
Phenol Red Broth Base (Merck 1.10987)
Rhamnose (Merck 1.04736)
Xylose (Merck 1.08689)
Kanlı Agar
Staphylococcus aureus
Rhodococcus equi

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa 25 gram katı gıda 225 mL Buffered Listeria Enrichment Broth besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir.

-Besiyeri önce 30 °C'da 4 saat inkübe edilir, sonra selektif katkı ilave edilip, aynı sıcaklıkta 44 saat daha inkübe edilir. İnkübasyonun başlangıcından itibaren 24 ve 48. saatlerde Oxford ve/veya PALCAM Agar besiyerine sürme yapılır.

-Analizin diğer aşamaları ISO yönteminde olduğu gibidir (bakınız 20.01. Bölüm).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

20.04. Var/yok Testi; IDF Yöntemi

L. monocytogenes, Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF) yöntemine göre Listeria Enrichment Broth besiyerinde tek aşamalı zenginleştirme ile aranır.

Listeria Enrichment Broth bazal besiyeri FDA ve IDF yöntemlerinde farklıdır. Ancak her iki yöntemde de aynı katkı kullanılır.

Kullanılan Malzeme

Listeria Enrichment Broth (LEB) acc. to FDA/IDF (Merck 1.11951)
Listeria Enrichment Broth (LEB) Supplement acc. to FDA/IDF (Merck 1.11781)
PALCAM Agar (Merck 1.11755)
PALCAM Agar Selective Supplement (Merck 1.12122)
Oxford Agar (Merck 1.07004)
Oxford Agar Selective Supplement (Merck 1.07006)
Tryptone Soya Yeast Extract (TSYE) Agar
Phenol Red Broth Base (Merck 1.10987)
Rhamnose (Merck 1.04736)
Xylose (Merck 1.08689)
Kanlı Agar
Staphylococcus aureus
Rhodococcus equi

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa 25 gram katı gıda 225 mL Listeria Enrichment Broth besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir. Bazal besiyerinin katkısı gıda ile birlikte eklenir. Bununla birlikte, gıdada hasar görmüş Listeria varlığından kuşku duyuluyor ise katkı ilave edilmeden 4 saat inkübasyon önerilebilir.

-30 °C'da 48 saat inkübasyondan sonra Oxford ve/veya PALCAM Agar besiyerine sürme yapılır.

-Analizin diğer aşamaları ISO yönteminde olduğu gibidir (bakınız 20.01. Bölüm).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

20.05. Singlepath *Listeria* ile Hızlı Analiz

Kullanılan Malzeme

Fraser Broth Base (Merck 1.10398)

Fraser Broth Supplement (Merck 1.10399)

Buffered *Listeria* Enrichment Broth (LEB) acc. to FDA (Merck 1.09628)

Listeria Selective Enrichment Supplement acc. to FDA&IDF (Merck 1.11781)

Singlepath *Listeria* (Merck 1.04142)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız. Yöntem şematik olarak Ek A 13'te gösterilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. 25 g katı gıda tartılır ve 225 mL Fraser Broth besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir. Gıdada hasar görmüş *Listeria* olmasından endişe ediliyorsa, Fraser Broth besiyeri önce 30 °C'da 4 saat inkübe edilir, selektif katkı bu inkübasyondan sonra besiyerine eklenir.

-Toplam 18–24 saat süre ile 30 °C'da yapılan inkübasyondan sonra 0,1 mL ön zenginleştirme kültürü 10 mL Buffered *Listeria* Enrichment Broth (LEB) acc. to FDA besiyerine ya da 1/1 Fraser Broth'a aktarılıp, 30 °C'da 18–24 saat inkübe edilir.

-İnkübasyon bitiminde bu kültürden cam bir tüpe 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) Singlepath *Listeria* kitine uygulanır. 20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde, dolayısı ile gıdada *Listeria* spp. olduğunu gösterir. Pozitif sonuç alındığında doğrulama için standart bir katı besiyerine sürme yapıp sonucun doğrulanması ve tür belirlemesi önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuç alınırsa analize devam etmenin gereği yoktur. Gıdada "*Listeria* spp. olmadığına göre *L. monocytogenes* de yoktur" şeklinde sonuç verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not 1: Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

Not 2: Flagella oluşumu için inkübasyon 30 °C'da yapılır. *Listeria*, 37 °C'da yeterli flagella oluşturmaz ve buna bağlı olarak sahte negatif sonuç alınır.

21. *Clostridium* spp. ve *Cl. perfringens*

21.01. Katı Besiyerinde <i>Cl. perfringens</i> Sayımı	199
21.02. <i>Cl. perfringens</i> Aranması	200
21.03. Sülfid İndirgeyen <i>Clostridium</i> Sayımı	201

Clostridium perfringens, gıda zehirlenmelerine yol açan bir bakteridir. Amaca göre gıdalarda aranır ya da sayılır.

Not 1: *Cl. perfringens* sporlu bir bakteri olmakla birlikte, vejetatif hücreleri düşük sıcaklıklara çok duyarlıdır. Bu nedenle *Cl. perfringens* analizinde gıda örneği 10–15 °C arasında tutularak olanaklar ölçüsünde hızla analize alınmalıdır. Gıdanın analizi 8 saatten sonra yapılacak ise steril gliserin–tuz çözeltisinde kuru buz kullanılarak –60 °C'da korunur.

Not 2: *Cl. perfringens* anaerob bakteri olduğu için homojenizasyon sırasında hava ile fazlaca temas etmemelidir.

Not 3: Çoğu standartta değinilen "sülfid indirgeyen anaeroblar" ve "sülfid indirgeyen *Clostridium*" ile "*Clostridium perfringens*" gıda mikrobiyolojisi açısından pratikte aynı şeydir. Bununla beraber, ISO tarafından farklı besiyerleri önerildiği için burada her 2 grup ayrı olarak alınmıştır.

21.01. Katı Besiyerinde *Cl. perfringens* Sayımı

Kullanılan Malzeme ve Katkıları

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar (Merck 1.11972)
TSC Agar Katkısı (Merck 1.00888)
Gliserin–Tuz Çözeltisi
Anaerobik İnkübasyon Gereçleri
UV El Lambası Merck (1.13203)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır. Homojenizasyonda blender kullanılacak ise düşük devir ve süre kullanılır. Gıda analizi 8 saatten daha uzun bir sürede yapılacaksa steril gliserin-tuz çözeltisinde korunur.

-Tüp içindeki örnek, kaynar su banyosuna daldırılır, aynı çeper kalınlığındaki tüpte bulunan bir diğer örneğe termometre yerleştirilir.

-Kontrol tüpündeki sıcaklık 80 °C'a eriştiğinde her iki tüp su banyosundan çıkarılır, kontrol tüpünün sıcaklığı kontrol edilerek sıcaklık 79 °C'a düştüğünde tekrar kaynar su banyosuna beraberce daldırılırlar. Bu şekilde 5 dakika tutulduktan sonra test tüpü oda sıcaklığındaki su banyosuna alınır ve soğutulur. Pek çok uluslararası standartta soğutmanın buz banyosu içinde ve hızla yapılması gerektiğine dikkat çekilir. Soğutma şekli ilgili talimatta yazılmalıdır.

-Gerekli ise seyreltmeler bu aşamada (pastörizasyondan sonra) yapılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-İnkübasyon sonunda (37 °C'da 24–48 saat) TSC Agar besiyerinde gelişen siyah renkli koloniler (bakınız; Ek B 27) sülfid indirgeyen anaeroblar (sülfid indirgeyen *Clostridium* spp.) olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir. TSC Agar katkısı ilave edilmiş besiyerinde *Cl. perfringens* uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışığa ile belirlenir (bakınız; Ek B 28).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

21.02. *Cl. perfringens* Aranması

Bu metinde 10 g (mL) gıda örneğinde var/yok testi ile *Cl. perfringens* analizi verilmiştir. 1, 5, 25 g (mL) vb. gibi miktarların analizinde sadece miktar ile orantılı olarak kullanılan besiyeri hacmi değişir. Genel olarak analiz edilen gıdanın 9–10 misli sıvı besiyeri kullanılır. Bu analiz, çok farklı besiyerleri ile yapılabilir.

Kullanılan Malzeme

Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM) (Merck 1.11699)

Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar (Merck 1.11972)

TSC Agar Katkısı (Merck 1.00888)

Gliserin-Tuz Çözeltisi

Sıvı Parafin (Merck 1.07160)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan DRCM besiyeri içinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanıldığında minimum sıvı hacmi uyarınca -örneğin, 25 g gıda + 225 mL broth kullanılma zorunluluğu varsa- homojenizasyon sonrası 10 gram gıda karşılığı olarak 100 mL homojenizat steril erlene alınır. Blender, düşük devir ve sürede kullanılmalıdır. Analiz 8 saatten daha uzun bir sürede yapılacaksa, gıda steril gliserin-tuz çözeltisinde -60 °C'da dondurularak korunur.

-Anaerob ortam sağlanması için besiyeri üzeri ya 1 cm kalınlıkta olacak şekilde steril sıvı parafin ile kapatılır ya da tercihen anaerob ortamda inkübe edilir.

- Erlen 37 °C'da 7 gün süre ile inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda erlende siyah renk oluşumu görülür ise standart boy Petri kutusuna 1 mL aktarılır, üzerine katkısı ilave edilmiş TSC Agar dökülür.

- DRCM besiyerinde mikrobiyel gelişme yoksa, analiz bitirilir ve analiz edilen 10 g (mL) gıdada koliform grup bakterisi olmadığına karar verilir. Bazı standartlara göre DRCM besiyerinde gözle görülür bir mikrobiyel gelişme olmasa da TSC Agar'a inokülasyon yapılmalıdır.

-İnkübasyon sonunda (37 °C'da 24–48 saat) TSC Agar besiyerinde gelişen siyah renkli koloniler (bakınız; Ek B 27) sülfid indirgeyen anaeroblar (sülfid indirgeyen *Clostridium* spp.) olarak değerlendirilir ve "analiz edilen 10 g (mL) gıdada *Clostridium* spp. var" şeklinde sonuç verilir. TSC Agar katkısı ilave edilmiş besiyerinde *Cl. perfringens* uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışığa ile belirlenir (bakınız; Ek B 28).

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

21.03. Sülfid İndirgeyen *Clostridium* Sayımı

ISO 15213'e göre sülfid indirgeyen bakterilerin anaerobik ortamda sayımıdır. Var/yok testi ile de değerlendirilebilir. Bu yöntem sülfid indirgeyen tüm bakterilerin varlığını göstermekle beraber, anaerobik ortamda gelişen koloniler *Clostridium perfringens* olarak da değerlendirilir.

Kullanılan Malzeme

Anaerobik Seyreltme Çözeltisi
Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
Sulfite Iron Agar (Merck 1.10864)
Anaerobik İnkübasyon Gereçleri

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır. Homojenizasyonda blender, düşük devir ve sürede kullanılmalıdır. Analiz 8 saatten daha uzun bir sürede yapılacaksa, gıda steril gliserin–tuz çözeltisinde -60 °C'da dondurularak korunur.

-Pastörizasyon, 21.01. Bölümde verildiği şekilde yapılır.

-Gerekli ise seyreltmeler bu aşamada (pastörizasyondan sonra) yapılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den dökme yöntemi ile ekim yapılır. Sulfite Iron Agar besiyeri katılaştıktan sonra üzerine 10 mL kadar aynı besiyerinden dökülür ve 37 °C'da 24–48 saat anaerobik olarak inkübe edilir. İlk 24 saatte Petri kutuları incelenmelidir.

-Ekimi yapılan bir başka Sulfite Iron Agar Besiyeri üzerine ikinci kat dökülmeden aerobik olarak inkübasyona bırakılması ve bu Petri kutusunda tipik koloni görülmemesi gerekir. Termofilik bakterilerin varlığından şüphe ediliyorsa inkübasyon 50 °C'da yapılmalıdır.

-İnkübasyon sonunda siyah ve çoğunlukla etrafı siyah zonlu koloniler sülfid indirgeyen anaerob bakteri (pratik uygulamada *C. perfringens*) olarak sayılır, bakteri sayısı standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

22. Enterokoklar

22.01. Sularda Var/yok Testi	203
22.02. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz	203
22.03. EMS Yöntemi ile Sayım	204

Enterokoklar hijyen indeksi olarak gıda maddeleri ve sularda aranır ya da sayılır. *E. coli* ve diğer fekal koliformlara oranla çevresel faktörlere daha dirençli oldukları için özellikle su örneklerinde fekal kontaminasyonun belirlenmesinde önemlidir.

22.01. Sularda Var/yok Testi

Kullanılan Malzeme

ReadyCult Enterococci (Merck 1.01299)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Su örneği mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir, steril uygun bir kaba (erlen, şişe vb.) 100 mL olarak aktarılır.

-Önceden ısıtılarak sterilize edilmiş besiyerinin ambalajı aseptik koşullara uyularak açılır, dehidre besiyerinin tümü su örneğine aktarılır, tüm partiküller eriyinceye kadar elle ve yavaşça karıştırılır.

-İnkübasyon sonrasında (37 °C'da 24±2 saat) besiyeri renginin mavi–yeşile dönüşmesi (bakınız; Ek B 29), analiz edilen suda enterokok varlığını gösterir ve "100 mL suda enterokok var" şeklinde sonuç verilir. Besiyeri rengi değişmezse "100 mL suda enterokok olmadığı" anlaşılır. İnkübasyon sonunda orijinal sarı renk korunuyor -ancak bulanıklık varsa- enterokok dışında bakteriyel gelişmeye karar verilir ve analiz sonucu yine "100 mL suda enterokok yok" şeklinde düzenlenir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

22.02. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Analiz

Gıdalarda ve özellikle su örneklerindeki enterokok sayısı membran filtrasyon yöntemi ile belirlenebilir. Sularda var/yok testi amacı ile de uygulanabilir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltilisi (Merck 1.15525)

m- Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley (Merck 1.05262)

Not: Membran filtrasyon üreticisi firmalar tarafından ped üzerine emdirilerek hazırlanmış besiyerleri üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılır.

Analiz

-Öncelikle "07.03. Membran Filtrasyon" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda (su) doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon gerekli ise Maximum Recovery Diluent kullanılır. Yağsız süt ürünleri -ön filtrasyon koşuluyla- ¼ Ringer çözeltisi ile homojenize edilir.

-Örnek, membran filtrasyondan geçirilir ve filtre Petri kutusunda hazırlanmış besiyeri üzerine yerleştirilir. Bu amaçla standart 9 cm ya da filtreye uygun olmak üzere 6 cm çaplı Petri kutuları kullanılır.

-Petri kutusu, kapağı üste gelecek şekilde (tabanı üzerine) 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.

-Besiyerindeki (m-Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley Agar) 0,5–2 mm çaplı pembe koloniler (bakınız; Ek B 30) enterokok olarak sayılır ve örnekteki sayı standart yöntemle hesaplanır.

-Sayım ya da var/yok analiz sonuçları standart şekilde verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

22.03. EMS Yöntemi ile Sayım

Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294) kullanılarak standart şekilde EMS yöntemi uygulanır. Tüpler 37 °C'da 24 saat süre ile inkübe edilir. İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve besiyeri renginin mavi–yeşile dönmesi (bakınız; Ek B 29) "enterokok" pozitif olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak enterokok sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

23. *Bacillus cereus*

23.01. Katı Besiyerinde Sayım	205
23.02. <i>Bacillus cereus</i> Tanımlanması	206
23.03. EMS Yöntemi ile Sayım	207
23.04. Var/yok Testi	208

Bacillus cereus, toprak kökenli bakteri olup, gıda zehirlenmelerine yol açar. Baharat gibi gıdalarda sınırlı sayıda bulunmasına izin verilebilir. UHT yöntemi ile üretilen uzun ömürlü sütlerde de bozulmaya neden olur.

Not 1: Gıdalarda *B. cereus* analizinde *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. mycoides* de *B. cereus* gibi tipik koloniler verir. Bu kolonilerin standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında *B. cereus* olup olmadıklarının belirlenmesi oldukça zordur. Bununla beraber, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. mycoides* gıdaların günlük analizinde oldukça nadir olarak ortaya çıkarlar. Bu neden ile tipik koloniler *B. cereus* olarak kabul edilir. 23.02. Bölümde tanımlama temel testleri verilmiştir.

Not 2: Sadece *B. cereus* sporlarının analizi isteniyor ise sporlu bakterilerin analizi kurallarına uyularak homojenizat (ya da örnek sıvı ise doğrudan örneğin kendisi) 80 °C'da 5 dakika pastörize edilir.

23.01. Katı Besiyerinde Sayım

Kullanılan Malzeme ve Katkıları

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
MYP Agar (Cereus Selective Agar acc. to Mossel; Merck 1.05267)
Bacillus cereus Selective Supplement (Merck 1.09875)
Egg-yolk Emulsion (Merck 1.03784)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Tüp içindeki örnek, kaynar su banyosuna daldırılır, aynı çeper kalınlığındaki tüpte bulunan bir diğer örneğe termometre yerleştirilir.

-Kontrol tüpündeki sıcaklık 80 °C'a eriştiğinde her iki tüp su banyosundan çıkarılır, kontrol tüpünün sıcaklığı kontrol edilerek sıcaklık 79 °C'a düştüğünde tekrar kaynar su banyosuna beraberce daldırılırlar. Bu şekilde 5 dakika tutulduktan sonra test tüpü oda sıcaklığındaki su banyosuna alınır ve soğutulur. Pek çok uluslararası standartta soğutmanın buz banyosu içinde ve hızla yapılması gerektiğine dikkat çekilir. Soğutma şekli ilgili talimatta yazılmalıdır.

-Gerekli ise seyreltmeler bu aşamada (pastörizasyondan sonra) yapılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-İnkübasyon sonunda (28 °C'da 48 saat) MYP Agar besiyerinde yaygın, kuru, pembe–menekşe merkezli ve etrafında yoğun bir presipitat olan koloniler (bakınız Ek B 31) *Bacillus cereus* olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

23.02. *Bacillus cereus* Tanımlanması

B. cereus kolonilerinin etrafındaki yoğun presipitat zonu tipiktir. Etrafında sarı ya da beyaz bir zon olan koloniler *B. cereus* değildir.

B. cereus için tipik biyokimyasal test sonuçları; D(+) glikozun anaerobik kullanımı, Voges–Proskauer (VP), jelatinin hidrolizi ve nitrat indirgeme pozitifdir.

Glikozun anaerobik kullanımı Dextrose Caseine Peptone Agar (Merck 1.10860) ya da basitçe Phenol Red Broth Base (Merck 1.10987) besiyerine glikoz (Merck 1.08342) ilavesi ile yapılır ve 28–30 °C'da 24 saat anaerobik inkübasyon sonunda asitlik gelişmesi, pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir (bakınız; 37.07. Bölüm). Dextrose Caseine Peptone Agar da tüpte hazırlanır, kullanılmadan önce kaynatılarak oksijenin çıkması sağlanır. Hızla soğutulup, aşı iğnesi ile dibe kadar daldırma ekim yapılır. Anaerob inkübasyona gerek yoktur. İnkübasyon sonunda özellikle dipte sarı renk oluşumu pozitif reaksiyondur. Jelatin testi için CASO Broth (Merck 1.05459) besiyerine %15 Gelatin (Merck 1.04070) ilave edilir ve tüplere dağıtıp, otoklavda 115 °C'da sterilize edilir. Aşılınmış besiyeri 28–30 °C'da en az 48 saat inkübe edilip, tüp buzdolabında soğutulur. Soğumuş besiyerinin sıvı halde olması jelatinin hidrolize edildiğini gösterir. VP testi MR–VP Broth besiyerinde yapılır (bakınız; 37.05. Bölüm).

23.03. EMS Yöntemi ile Sayım

Bacillus cereus 'un standart analiz yöntemi ile belirlenemeyecek kadar az olması halinde, ISO 7932 standart EMS yöntemiyle sayılmasını önermektedir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

CASO Broth + Polymxin B Sulfate

MYP Agar (Cereus Selective Agar acc. to Mossel; Merck 1.05267)

Bacillus cereus Selective Supplement (Merck 1.09875)

Egg-yolk Emulsion (Merck 1.03784)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Sadece sporlu bakterilerin sayımı isteniyorsa 23.01. Bölümde verildiği şekilde pastörizasyon uygulanır ve seyreltme bu aşamadan sonra yapılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak CASO Broth + Polymxin B Sulfate tüplerine ekim yapılır. CASO Broth + Polymxin B Sulfate besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanabilir (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-Tüpler 28–30 °C'da 48 saat süre ile inkübe edilir.

-İnkübasyon sonunda gözle görülebilir şekilde belirgin bir bulanıklık (üreme) görülen tüpler muhtemel pozitif olarak işaretlenir ve bunlardan *Cereus Selective* Agar besiyerine sürme yapılır.

-İnkübasyon sonunda (28 °C'da 48 saat) MYP Agar besiyerinde yaygın, kuru, pembe–menekşe merkezli ve etrafında yoğun bir presipitat olan koloniler (bakınız Ek B 31) *Bacillus cereus* olarak değerlendirilir. Gerekirse 23.02. Bölümde verildiği şekilde koloniler tanımlanır. *Bacillus cereus* görülen Petri kutularının ekim yapıldığı tüpler "*B. cereus* pozitif" olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak *B. cereus* sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

23.04. Var/yok Testi

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

CASO Broth + Polymxin B Sulfate

Cereus Selective Agar acc. to Mossel (Merck 1.05267)

Bacillus cereus Selective Supplement (Merck 1.09875)

Egg-yolk Emulsion (Merck 1.03784)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan CASO Broth + Polymxin B Sulfate içinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanıldığında minimum sıvı hacmi uyarınca -örneğin, 25 g gıda + 225 mL broth kullanılma zorunluluğu varsa- homojenizasyon sonrası 10 gram gıda karşılığı olarak 100 mL homojenizat steril erlene alınır. Sadece sporlu *B. cereus* var/yok testi yapılacaksa erlen, 23.01. Bölümde anlatıldığı gibi pastörize edilir.

-Erlen, 28–30 °C'da 24±2 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda MYP Agar besiyerinde yaygın, kuru, pembe–menekşe merkezli ve etrafında yoğun bir presipitat olan koloniler (bakınız; Ek B 31) *B. cereus* olarak değerlendirilir. Standart var/yok test kurallarına göre sonuç verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

MERCK *Bacillus cereus* Besiyerleri

Bacillus cereus Selective Supplement	1.09875	16 vial
Cereus Selective Agar Base acc. to MOSSEL	1.05267	500 g
Dextrose Casein-peptone Agar	1.10860	500 g
Egg-yolk Emulsion (sterile)	1.03784	100 ml

24. *Yersinia enterocolitica*

24.01. Var/yok Testi	209
24.02. <i>Yersinia enterocolitica</i> Tanımlanması	209

24.01. Var/yok Testi

Kullanılan Malzeme

Yersinia Selective Enrichment Broth acc. to OSSMER (Merck 1.16701)
Yersinia (CIN) Agar Base (Merck 1.16434)
CIN Agar Supplement (Merck 1.16466)
SSDC Agar (Merck 1.16724)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Beklenen kontaminasyon düzeyine göre gıda, Yersinia Selective Enrichment Broth acc. to OSSMER besiyerine 1:10 ya da 1:100 oranında ilave edilir.

-Erlen 28–30 °C'da 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda fark edilir bir gelişme görülme bile CIN Agar ve/veya SSDC Agar besiyerine sürme yapılır.

-Petri kutuları 28–30 °C'da 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda tipik koloni gelişimi görülmez ise inkübasyon 24 saat daha devam eder.

-Tipik kolonilere rastlanması halinde "analiz edilen örnekte *Y. enterocolitica* vardır" şeklinde standart rapor verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

24.02. *Yersinia enterocolitica* Tanımlanması

SSDC Agar besiyerinde düzgün, renksiz, 1 mm çaplı, 10 büyütme güçlü steromikroskop ile incelendiğinde merkezde belirgin bir granülleşme görülen koloniler *Yersinia enterocolitica* olarak işaretlenir. *Y. enterocolitica* CIN Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı, düzgün, merkezleri koyu kırmızı, etrafları belirgin berrak zonlu mat koloni oluşturur. Koloni morfolojisi serotipe göre önemli ölçüde değişir (bakınız; Ek B 32 ve Ek B 33).

MERCK Maya ve Küf Besiyerleri

Candida Elective Agar acc. to NICKERSON	1.10456	500 g
CZAPEK-DOX Agar	1.05460	500 g
Dichloran Glycerol (DG18) Agar	1.00465	100 g
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar	1.00466	500 g
Fungi Agar Base acc. to KIMMIG, modified	1.05414	500 g
Malt Extract Agar	1.05398	500 g
Malt Extract Broth	1.05397	500 g
OGY Agar (Oxytetracycline Glucose Yeast Agar), Base	1.10877	500 g
OGY Selective Supplement	1.09877	15 vial
Potato Dextrose Agar	1.10130	500 g
Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar	1.00467	500 g
SABOURAUD-2 % Dextrose Agar	1.07315	500 g
SABOURAUD-2 % Dextrose Broth	1.08339	500 g
Universal Beer Agar (UBA Medium)	1.00445	500 g
WL Nutrient Agar	1.10866	500 g
Wort Agar	1.05448	500 g
Wort Broth, Base	1.05449	500 g
Yeast Extract Agar	1.03750	500 g
YGC Agar	1.16000	500 g

MERCK *Listeria* Besiyerleri

Buffered Listeria Enrich. Broth Base acc. to FDA/BAM 1995 ...	1.09628	500 g
FRASER Listeria Selective Enrichment Broth (base)	1.10398	500 g
FRASER Listeria Supplement (2 x 8 vial)	1.10399	1kutu
L-PALCAM Listeria Selective Enrichment Broth Base	1.10823	500 g
Listeria Enrichment Broth (LEB) acc. to FDA/IDF-FIL	1.10549	500 g
Listeria Enrichment Broth (LEB) Base acc. to FDA/IDF-FIL	1.11951	500 g
Listeria Selective Enrichment Supplement	1.11781	16 vial
Oxford Listeria Selective Agar, Base	1.07004	500 g
Oxford Listeria Selective Supplement	1.07006	13 vial
PALCAM Listeria Selective Agar Base	1.11755	500 g
PALCAM Listeria Selective Supplement	1.12122	16 vial
UVM-II Supplement	1.04039	1 vial
UVM-Listeria Selective Enrichment Broth, modified	1.10824	500 g

25. *Vibrio parahaemolyticus*

25.01. Var/yok Testi	211
25.02. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Tanımlaması	211

25.01. Var/yok Testi

Kullanılan Malzeme

Alkali Pepton Besiyeri
TCBS Agar (Merck 1.10263)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. 25 gram katı gıda 225 mL Alkali Pepton besiyeri içinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir. İnkübasyon, 35–37 °C'da 8 saat süre ile yapılır. Dondurulmuş ürünlerde inkübasyon süresinin 18–24 saat olması önerilmektedir.

-Bu sürenin sonunda TCBS Agar besiyerine öze ile sürme yapılır, 35–37 °C'da 18–24 saat inkübasyona bırakılır.

-Tipik *V. parahaemolyticus* kolonilerine rastlanması halinde temel biyokimyasal testlerle tanımlama yapılır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

25.02. *Vibrio parahaemolyticus* Tanımlaması

V. parahaemolyticus TCBS Agar besiyerinde yeşil, dairesel ve yaklaşık 2 mm çaplı koloni oluşturur (bakınız; Ek B 34). Tanımlanması için bir seri biyokimyasal test uygulanmalıdır. NaCl (30,0 g/L) ilave edilmiş Triple Sugar Iron Agar (yatık) besiyerine standart şekilde daldırma ve yüzeye sürme şeklinde ekim yapılır. 35–37 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra *V. parahaemolyticus* reaksiyonu yüzey kırmızı (laktoz ve sakkaroz negatif), dip sarı (glikoz pozitif, H₂S negatif), gaz yarıkları yok (glikozdan gaz oluşturma negatif) şeklindedir. NaCl (25,0 g/L) ilave edilmiş Tryptone Water besiyerine inokülasyon ve 35–37 °C'da 24 saat inkübasyon yapılır. *V. parahaemolyticus* indol pozitif bir bakteridir.

MERCK *Staphylococcus aureus* Besiyerleri

BAIRD-PARKER Agar	1.05406	500 g
CHAPMAN Agar	1.05469	500 g
Egg-yolk Tellurite Emulsion 20% (sterile)	1.03785	50 ml
GIOLITTI-CANTONI Broth	1.10675	500 g
Mannitol Salt Phenol-red Agar	1.05404	500 g
Staphylococcus Enrich.Broth Base acc. to BAIRD	1.07899	500 g
VOGEL-JOHNSON Agar, Base	1.05405	500 g

MERCK *Clostridium* Besiyerleri

Clostridium perfringens Supplement	1.00888	16 vial
Differential Clostridial Agar (DCA) acc. to WEENK	1.10259	500 g
Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM)	1.11699	500 g
Fluid Thioglycollate Medium G	1.16761	500 g
Fluid Thioglycollate Medium	1.08191	500 g
Reinforced Clostridial Agar	1.05410	500 g
SPS Agar (Perfringens Selective Agar; ANGELOTTI)	1.10235	500 g
Sulfite Iron Agar, Base	1.10864	500 g
Thioglycollate Broth	1.08190	500 g
TSC Agar (Tryptose Sulfite Cycloserine Agar), Base	1.11972	500 g
TSN Agar (Perfringens Selective Agar; MARSHALL)	1.05264	500 g
Tyrobutyricum Broth Base	1.11734	500 g

MERCK *Enterococcus* Besiyerleri

Azide Dextrose Broth	1.01590	500 g
BROLACIN Agar	1.01638	500 g
Bromocresol-purple Azide Broth	1.03032	500 g
CATC Agar (Citrate Azide Tween® Carbonate) Base	1.10279	500 g
Chromocult® Enterococci Broth	1.10294	500 g
Esculin Bile Agar	1.11432	500 g
Kanamycin Esculin Azide Agar	1.05222	500 g
KF Streptococcus Agar Base	1.10707	500 g
KING Agar B, Base	1.10991	500 g
Membrane-filter Enterococcus Selective Agar acc. to SLANETZ and BARTLEY	1.05262	500 g
Membrane-filter Enterococcus Selective Agar Base acc. to SLANETZ and BARTLEY	1.05289	500 g
Readycult® Enterococci	1.01299	20 test

26. *Aeromonas* Türleri

26.01. Var/yok Testi	213
26.02. Katı Besiyerinde Sayım	213
26.03. Membran Filtrasyonla Sularda <i>Aeromonas</i> Analizi	214

26.01. Var/yok Testi

Not: Kullanılan yöntem *A. hydrophila* yanında diğer *Aeromonas* türlerini de pozitif olarak verdiği için özel olarak *A. hydrophila* aranması amaçlanıyor ise izole edilen kolonilerin *A. hydrophila* olup olmadığı ayrıca test edilmelidir.

Kullanılan Malzeme

CASO (Tryptic Soy) Broth + Ampicillin
GSP Agar (Merck 1.10230)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda 25 gram tartılır ve doğrudan 225 mL CASO Broth + Ampicillin besiyeri içinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir.

-Erlen, 28–30 °C'da 18 saat inkübe edilir. Bu sürenin sonunda GSP Agar'a öze ile sürme yapılır, 28–30 °C'da 18 saat inkübasyona bırakılır.

-*Aeromonas* türleri GSP Agar besiyerinde büyük, 2–3 mm çaplı, sarı ve etrafı sarı zonlu koloni oluşturur.

-Tipik *Aeromonas* kolonilerine rastlanırsa "örneğin 25 g (mL)'ında *Aeromonas* spp. vardır" şeklinde rapor verilir. Tanımlama gerekli ise, basit testler yapılabilir. *Aeromonas* türleri oksidaz pozitif, trehaloz pozitif ve indol pozitif reaksiyon verir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

26.02. Katı Besiyerinde Sayım

Gıdalarda *Aeromonas* türleri GSP Agar besiyerinde standart yöntemle sayılır.

Kullanılan Malzeme

%0,1 Peptonlu Su
GSP Agar (Merck 1.10230)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, %0,1 Peptonlu Su çözeltisi kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den GSP Agar'a yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır. 28–30 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra 2–3 mm çaplı sarı renkli ve etrafı sarı zonlu koloniler *Aeromonas* olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir. Tanımlama gerekli ise, basit testler yapılabilir. *Aeromonas* türleri oksidaz pozitif, trehaloz pozitif ve indol pozitif reaksiyon verir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

26.03. Membran Filtrasyonla Sularda *Aeromonas* Analizi

Kullanılan Malzeme

m-Aeromonas Selective Agar Base (Merck 1.07621)
m-Aeromonas Selective Supplement (Merck 1.07625)

Analiz

Su örneklerinde membran filtrasyon yöntemi ile *Aeromonas* türlerinin belirlenmesi standart yöntemle yapılır (bakınız; 07.03. Bölüm). 35 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra m-Aeromonas Selective Agar'da gelişen sarı renkli koloniler (bakınız; Ek B 35) *Aeromonas* olarak sayılır ve standart şekilde sonuç verilir.

27. *Campylobacter*

27.01. Var/yok Testi	215
27.02. Singlepath <i>Campylobacter</i> ile Hızlı Analiz	216

Gıda mikrobiyolojisinde *Salmonella* ile birlikte kayda geçmiş en fazla hastalığa yol açan gıda kaynaklı patojenlerdir. ISO 10272'ye göre analizi temel olarak 41,5 °C'da zenginleştirme, selektif katı besiyerine sürme şeklinde yapılan var/yok testidir. *Campylobacter* analizi yapılacak gıda dondurulmamalı, gerekli ise buzdolabı sıcaklığında tutulmalı, olanaklar ölçüsünde hızla analiz yapılmalıdır.

27.01. Var/yok Testi

Kullanılan Malzeme, Katkıları ve Diğer Malzeme

Bolton Selective Enrichment Broth (Merck 1.00068)
Bolton Broth Selective Supplement (Merck 1.00069)
CCDA, modified (mCCDA; Merck 1.00070)
CCDA Selective Supplement (Merck 1.00071)
Campylobacter Selective Agar (Merck 1.02248)
Campylobacter Selective Supplement (Merck 1.02249)
Anaerobik İnkübasyon Gereçleri

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir, 25 g (mL) alınıp, 250 mL vida kapaklı cam şişede hazırlanmış 225 mL Bolton Broth besiyerine ilave edilir. *Campylobacter* mikroaerofilik bir bakteri olduğu için homojenizasyonu sırasında aşırı oksijen teması bakteriye zarar vererek sahte negatif sonuçlara neden olur. Bu nedenle blender kullanılmasından olabildiğince kaçınılmalıdır. Eğer vida kapaklı cam şişe yerine erlen kullanılıyor ise inkübasyon mikroaerofil koşullarda yapılmalıdır.

-Şişe önce 37 °C'da 4 saat, sonra 41,5 °C'da 42–44 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda mCCDA ve Campylobacter Selective Agar besiyerlerine sürme yapılır ve Petri kutuları 41,5 °C'da 24–48 saat süre yine mikroaerofilik ortamda inkübe edilir. İnkübasyonun ilk 24 saatinde Petri kutuları incelenir, tipik koloni görülmemesi durumunda inkübasyona 24 saat daha devam edilir.

-mCCDA besiyerinde grimsi, düz, ıslak görünümlü ve yayılma eğiliminde olan koloniler (bakınız; Ek B 36) ile *Campylobacter* Selective Agar besiyerinde gelişen gri-kahverengi berrak zonlu koloniler *C. jejuni* ya da *C. coli* olarak değerlendirilir.

-Tipik *Campylobacter* kolonilerine rastlanması halinde "25 g (mL) örnekte *Campylobacter jejuni* ve/veya *C. coli* vardır" şeklinde standart rapor verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

27.02. Singlepath *Campylobacter* ile Hızlı Analiz

Kullanılan Malzeme

Bolton Selective Enrichment Broth (Merck 1.00068)

Bolton Broth Selective Supplement (Merck 1.00069)

Singlepath *Campylobacter* (Merck 1.04143)

Anaerobik İnkübasyon Gereçleri

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız. Yöntem şematik olarak Ek A 14'te gösterilmiştir.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Tartım ve homojenizasyon 27.01. Bölümdeki gibi yapılır. Gıdada hasar görmüş *Campylobacter* olmasından endişe ediliyorsa, besiyeri önce 37 °C'da 4 saat süre ile mikroaerofilik ortamda inkübe edilir, sonra inkübasyon sıcaklığı 41,5 °C'a çıkarılıp inkübasyona 44 saat daha devam edilir. Eğer vida kapaklı cam şişe yerine erlen kullanılıyor ise inkübasyon mikroaerofil koşullarda yapılmalıdır.

-Toplam 48 saat süren inkübasyondan sonra bu kültürden cam bir tüpe 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) Singlepath *Campylobacter* kitine uygulanır.

-20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde *Campylobacter* olduğunu gösterir. Pozitif sonuçta selektif bir agara sürme yapıp sonucun doğrulanması önerilir. Negatif sonuçta analize devam etmenin gereği yoktur.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not : Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

28. *Alicyclobacillus*

28.01. Sayım	217
28.02. Var/Yok Testi	219

İlk kez ticari elma sularında bozulma etmeni olarak izole edilen *Alicyclobacillus* türleri bugün başta meyve suları ve konsantreleri olmak üzere gıda işletme suyu, salça, soslar vb. pek çok materyalde aranmakta ya da sayılmaktadır. İnsan sağlığına olumsuz bir etkisi olduğu bu güne kadar bilinmemektedir. Genel mikrobiyolojik yaklaşım ile yapılan test doğrudan bu bakteriye yönelik değildir. Analizler "termofilik asidofilik sporlu bakteri" aranması ya da sayılması üzerine kurulmuştur. Bununla beraber, pozitif sonuçlar *Alicyclobacillus* olarak değerlendirilir. Bu gruba giren bakteriler geniş bir sıcaklık ve asidik pH aralığında gelişebilmektedirler. *Alicyc. acidocaldiarius*, *Alicyc. acidoterrestris* ve *Alicyc. cycloheptanicus* olmak üzere 3 türü vardır. Bunlardan özellikle *Alicyc. acidoterrestris* meyve sularında sorun çıkarmaktadır ve buna bağlı olarak *Alicyclobacillus* olarak analizi yapılan bu türdür. Diğer türlerin analizi inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak farklı şekilde yapılmakla beraber, bu bölümde verilen yöntem ile yapılan analiz sonucu *Alicyc. acidoterrestris* olarak değil, *Alicyclobacillus* spp. olarak verilir.

Not 1: Ham materyalde ve meyve suyu konsantrelerinde, şuruplarda analiz öncesinde pastörizasyon uygulanarak vejetatif hücreler öldürülmelidir. Ancak, pazara sunulmuş olan son ürün olan meyve suyunda ve henüz üretilmiş meyve suyu konsantrelerinde ısıtma işlemiyle sporsuz bakteriler zaten öldürülmüş olduğu ve *Alicyclobacillus* türleri, bu ürünlerde vejetatif formda bulunabileceği için bu ürünlerin analizinde pastörizasyon yapılmamalıdır.

Not 2: Bu yöntemin salça gibi ürünlerde kullanılabilirliği uluslararası kontrol kuruluşları tarafından onaylanmamış olmakla beraber, gerek müşteri talepleri doğrultusunda gerek işletme kontrolleri için salça analizlerinde de günlük olarak kullanılmaktadır.

Not 3: 45 °C'da 5 güne kadar devam eden inkübasyon sırasında besiyerinde kuruma olur ve buna bağlı olarak tipik olmayan koloni morfolojisi nedeni ile sahte negatif sonuçlar alınabilir. Petri kutularının strech filme sarılarak inkübasyona bırakılması kurumayı önler. Inkübasyon sıcaklığı kritiktir.

28.01. Sayım

IFU (International Fruit juice Union) Metot 12'ye göre analiz edilecek örneğin pH'sı 4,0±0,2 olan BAT Agar besiyerinde standart yayma analiz yöntemi ile belirlenir. Membran filtrasyon yöntemi de kullanılabilir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

BAT Agar (Merck 1.07994)

Plate Count Agar (Merck 1.05463)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda ve su örnekleri mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Gerekli ise homojenizasyon Maximum Recovery Diluent ile yapılır. Ham madde, işletme suyu, önceden üretilmiş ve aseptik olmayan koşullarda depolanmış meyve suyu konsantresi gibi içinde *Alicyclobacillus* sporları dışında bakteri olması beklenen materyal önce pastörize edilir.

-Tüp içindeki örnek, kaynar su banyosuna daldırılır, aynı çeper kalınlığındaki tüpte bulunan bir diğer örneğe termometre yerleştirilir.

-Kontrol tüpündeki sıcaklık 80 °C'a eriştiğinde her iki tüp su banyosundan çıkarılır, kontrol tüpünün sıcaklığı kontrol edilerek sıcaklık 79 °C'a düştüğünde tekrar kaynar su banyosuna beraberce daldırılırlar. Bu şekilde 5 dakika tutulduktan sonra test tüpü buz banyosuna alınır ve hızla oda sıcaklığına kadar soğutulur.

-Gerekli ise seyreltmeler bu aşamada (pastörizasyondan sonra) yapılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma yöntemi ile ekim yapılır. Sayım yapılacak materyalden 0,1 mL alınıp, pH'sı 1 N H₂SO₄ ile 4,0±0,2'ye ayarlanmış BAT Agar besiyerine yayılır. 45 °C'da 3–5 gün süren inkübasyon sonunda oluşan bütün koloniler sayılır. Tipik *Alicyclobacillus* kolonileri Ek B 37'de verilmiştir.

-İşletme suyu ve berrak meyve suyu konsantreleri gibi örnekler membran filtrasyondan geçirilir, filtre yine BAT Agar besiyerine yerleştirilip, 45±0,1 °C'da 3–5 gün süren inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılır.

-Bazı maya türleri ve *Alicyclobacillus* olmayan bazı bakteriler de bu besiyerinde gelişebilir. Farklı morfolojideki kolonilerden örnek alınarak steril 1 mL Maximum Recovery Medium ortamında çözülüp, morfolojik olarak mikroskopta incelenir. Çubuk bakteri görünümünde olan izolat, standart Plate Count Agar besiyerine sürülür ve yine 45 °C'da 3–5 gün inkübe edilir. *Alicyclobacillus* türleri nötr pH'lı PCA besiyerinde gelişip, koloni oluşturamaz. İdentifikasyon esaslı sayım tekniği ile (bakınız, 07.01.05. Bölüm) Petri kutusundaki kolonilerin ne kadarının *Alicyclobacillus* olduğu belirlenir. Buradan analiz edilen örnekteki *Alicyclobacillus* spp. sayısı hesaplanır ve standart kurallara göre sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

28.02. Var/Yok Testi

Standart olarak zenginleştirme sonrası BAT Agar'a ekim yapılabileceği gibi, uygun materyal membran filtrasyon ile de analiz edilebilir.

Zenginleştirme için BAT Medium önerilmekle birlikte, bu besiyerinin ticari olarak hazırlanmış preparatı yoktur. BAT Agar besiyerinde agar dışındaki bileşenlerden hazırlanması ise oldukça zordur. Bu nedenle, özellikle meyve suyu konsantreleri ve salçada zenginleştirme işlemi Maximum Recovery Diluent ile yapılır. Bu şekilde seyreltilmiş olan materyaldeki besin maddeleri ve su aktivitesi *Alicyclobacillus* türlerinin gelişimine elverişlidir.

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

BAT Agar (Merck 1.07994)

Plate Count Agar (Merck 1.05463)

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda ve su örnekleri mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir.

-Son ürün meyve suları orijinal ambalajı içinde, aseptik olarak paketlenmiş meyve suyu konsantreleri 1:9 oranında Maximum Recovery Diluent ile seyreltildikten sonra 45 °C'da 10 gün inkübe edilir. Bu süre sonunda 0,1 mL örnek BAT Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekilir. 45 °C'da 3–5 gün inkübasyon sonunda koloni oluşumu izlenir. Petri kutularının mutfak tipi strech film ile sarılması gereklidir.

-Ham madde ile aseptik olarak doldurulmamış meyve suyu konsantrelerinde Maximum Recovery Diluent ile 1:9 oranında homojenize edilen materyal, şahit kullanılarak 80 °C'da 10 dakika pastörizasyondan sonra hızla 45 °C'a soğutulur, bu sıcaklıkta 10 gün inkübe edilir. Buradan alınan 0,1 mL örnek, BAT Agar'a yayma yöntemi ile ekilir. BAT Agar yine 45 °C'da 3–5 gün inkübe edilir ve bu süre sonunda koloni oluşumu izlenir.

-Su örnekleri ile membran filtreden geçirilebilen berrak meyve suları ile Maximum Recovery Diluent ile seyreltilip membran filtreden geçirilebilen berrak meyve suyu konsantreleri, materyal özelliğine göre gerekirse 80 °C'da 10 dakika pastörize edilerek membran filtrasyondan geçirilir, filtre BAT Agar'a yerleştirilip, 45 °C'da 3–5 gün süren inkübasyon sonunda koloni oluşumu izlenir ve sonunda oluşan bütün koloniler sayılır. Tipik *Alicyclobacillus* kolonileri Ek B 37'de verilmiştir.

-Bazı maya türleri ve *Alicyclobacillus* olmayan bazı bakteriler de bu besiyerinde gelişebilir. Farklı morfolojideki kolonilerden örnek alınarak steril 1 mL Maximum Recovery Medium ortamında çözülüp, morfolojik olarak mikroskopta incelenir. Çubuk bakteri görünümünde olan izolat, standart Plate Count Agar besiyerine sürülür ve yine 45 °C'da 3–5 gün inkübe edilir. *Alicyclobacillus* türleri nötr pH'lı PCA besiyerinde gelişip, koloni oluşturamaz. Sonuçlar var/yok testi kurallarına göre verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

MERCK Yersinia Besiyerleri

Salmonella Shigella Agar with Sodium Deoxycholate and Calcium Chloride (SSDC)	1.16724	500 g
Yersinia Selective Agar Base (CIN-Agar)	1.16434	500 g
Yersinia Selective Enrichment Broth	1.16701	500 g
Yersinia Selective Supplement (CIN)	1.16466	16 vial

MERCK Campylobacter Besiyerleri

Bolton Broth Base	1.00068	500 g
Bolton Supplement	1.00069	16 vial
Campylobacter Blood-Free Agar Base (modified CCDA)	1.00070	500 g
CCDA Supplement	1.00071	16 vial
Campylobacter Selective Agar Base	1.02248	500 g
Skirrow Supplement	1.02249	16 vial

MERCK Aeromonas Besiyerleri

GSP Agar	1.10230	500 g
m-Aeromonas Agar	1.07621	500 g
m-Aeromonas Supplement	1.07625	16 vial

29. *Clostridium tyrobutyricum*

29.01. EMS Yöntemi ile Sayılması	221
29.02. Var/yok Testi	222

Çiğ süte çoğunlukla silajdan bulaşan ve laktatı fermente ederek bütirik asit, asetik asit ve gaz (H_2 ve CO_2) oluşturan sporlu anaeroblar içinde peynirlerde geç şişme etmeni olarak tanımlanan bakteri *Clostridium tyrobutyricum* 'dur. Her ne kadar *Cl. butyricum* ve *Cl. sporogenes* de bu kapsam içinde değerlendirilmekle beraber, analiz yöntemleri *Cl. tyrobutyricum* belirlenmesi/sayılması üzerine kurulmuştur.

Not: Bu bakterinin analizinde sporsuz refakatçi bakterilerin eliminasyonu için pastörizasyon uygulanmaktadır. Bu işlem sırasında vejetatif formdaki *Cl. tyrobutyricum* da ölür ve sayım sonucu beklenildiğinden çok daha az çıkabilir. Hatta, yine bu nedenle sayım sonucu "yok" olarak alınırsa bu sonuç sadece analiz edilen örnekte spor formunda *Cl. tyrobutyricum* olmadığını gösterir.

29.01. EMS Yöntemi ile Sayılması

Kullanılan Malzeme

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
Bryant and Burkey Medium (Merck 1.01617)
Tyrobutyricum Base
%50 Sodyum Laktat (Merck 1.06522)
Katı Parafin (Merck 1.07158)
Su Agar

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Tüp içindeki örnek, kaynar su banyosuna daldırılır, aynı çeper kalınlığındaki tüpte bulunan bir diğer örneğe termometre yerleştirilir.

-Kontrol tüpündeki sıcaklık 80 °C'a eriştiğinde her iki tüp su banyosundan çıkarılır, kontrol tüpünün sıcaklığı kontrol edilerek sıcaklık 79 °C'a düştüğünde tekrar kaynar su banyosuna beraberce daldırılırlar. Bu şekilde 5 dakika tutulduktan sonra test tüpü buz banyosuna alınır ve hızla oda sıcaklığına kadar soğutulur.

Taze peynirde hasar görmüş *Cl. tyrobutyricum* analizinde 62,5 °C'da 30 dakikalık uygulamalara da rastlanılmaktadır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak Tyrobutyricum Broth ya da Bryant and Burkey Medium tüplerine ekilir. Tüplerin üzeri 2 cm kalınlıkta olacak şekilde (yaklaşık 4 mL) sterilize edilmiş ve 50 °C su banyosunda tutulan katı parafin ya da Su Agar ilave edilir. Su Agar ilavesinde agar katmanının tüp üzerinde donmasına dikkat edilir. Gerekiyorsa brothlar başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-Tüpler, 37 °C'da 7 gün inkübasyona bırakılır, 3. günden itibaren incelenir. Oluşan gaz ile parafin tabakasının yukarı itildiği tüpler pozitif olarak işaretlenir ve bunlar "*Cl. tyrobutyricum*" olarak değerlendirilir. EMS çizelgesi kullanılarak *Clostridium tyrobutyricum* sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Daha önce ticari olarak üretilen Tyrobutyricum Broth Base üretimden kaldırılmış, yerine Bryant and Burkey Medium (Merck 1.01617) getirilmiştir.

29.02. Var/yok Testi

Silaj, peyniraltı suyu, çiğ ya da pastörize süt vb. örnekler materyalin özelliğine göre pastörize edilerek ya da doğrudan var/yok testleri ile analize alınabilir. Kullanılan besiyerleri ve pastörizasyon işlemi 29.01. Bölümde verildiği gibidir.

Büyük tüplerdeki 45 mL besiyeri üzerine 5 g (mL) örnek ilavesi ile yapılır, standart var/yok analiz kurallarına göre sonuç verilir.

30. Anaeroblar

30.01. Katı Besiyerinde Sayım	223
30.02. EMS Yöntemi ile Sayım	224
30.03. Var/yok Testi	225

Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren anaeroblardan kasıt *Clostridium* türleridir. Bunun dışında başka anaerob ya da fakültatif anaerob bakteriler de gıdalarda bulunmakla birlikte, analizlerde belirlenenler genellikle bu cins üyeleridir. Diğer bir deyiş ile, analizler *Clostridium* türlerinin saptanması üzerine kurulmuştur.

Yine gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren *Clostridium* türleri içinde, özel koşullarda geliştirilmesi gerekenler yoktur. Bu nedenle basit olarak emzikli bir kavanoza vakum pompası ile vakum uygulanması, normal bir kavanoza yerleştirildikten sonra kavanozda yanar bir mum bırakılarak kapağının kapatılması (mum kavanozu), tüplerin üzerine katı parafin ve Petri kutularının üzerine ikinci kat agarlı besiyeri dökülmesi gibi uygulamalar çoğu defa yeterli anaerob koşul sağlamakla birlikte, standart analizlerde anaerob ortam sağlamak için geliştirilmiş özel sistemlerden yararlanılması gereklidir. Ayrıca *Campylobacter* türleri gibi özel atmosfer koşullarında geliştirilen bakteriler için bu sistemlerin kullanılması bir anlamda zorunludur.

Not 1: Anaerob bakterilerin analizinde *S. aureus* ve koliform bakteriler de gelişebilirler. Materyalin önceden pastörize edilmesi ya da özellikle Gram negatif bakterilerin gelişimini baskılamak için antibiyotik kullanılması önerilir.

Not 2: Amaca uygun olarak inkübasyon sıcaklığı seçilmelidir. Standart analizlerde kullanılan inkübasyon sıcaklığı 35–37 °C'dır. Inkübasyonda 28–30 °C ya da termofil anaeroblar için 55 °C kullanılır. Uygulanan inkübasyon sıcaklığı analiz raporunda belirtilmelidir.

30.01. Katı Besiyerinde Sayım

Kullanılan Malzeme

Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi
Anaerobik İnkübasyon Gereçleri
Reinforced Clostridial Agar (Merck 1.05410)
Polymyxin B Sulfate (Merck 1.06994)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmelerde, "anaeroblar için seyreltme çözeltisi" kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-Petri kutuları 35–37 °C'da 24–48 saat süre ile anaerob ortamda inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda Reinforced Clostridial Agar'da gelişen bütün koloniler "mezofil anaerob bakteri" olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not: Reinforced Clostridial Agar besiyerinde koliform grup bakteriler ve *Staph. aureus* gelişebilir. İdentifikasyon esaslı sayım tekniği (bakınız; 07.01.05. Bölüm) uyarınca Gram boyama yapılarak kolonilerin Gram reaksiyonu ve bakteri morfolojilerinin incelenmesi önerilir. Gram negatif bakterilerin baskılanması için sterilizasyon sonrası besiyerine 0,02 g/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş Polymyxin B Sulfate çözeltisi ilave edilmelidir.

30.02. EMS Yöntemi ile Sayım

Kullanılan Malzeme

Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi
Anaerobik İnkübasyon Gereçleri
Fluid Thioglycollate Medium (Merck 1.08191)
Thioglycollate Broth (Merck 1.08190)
Reinforced Clostridial Medium (Merck 1.05411)
Polymyxin B Sulfate (Merck 1.06994)
Sıvı Parafin (Merck 1.07160)
Su Agar

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmelerde "Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi" kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak Reinforced Clostridial Medium, Fluid Thioglycollate Broth ya da Fluid Thioglycollate Medium tüplerine ekim yapılır. Gerekirse besiyerleri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-Ekim sırasında pipetin olabildiğince tüpün dibine doğru sokularak materyalin buraya aktarılmasına dikkat edilir.

-Ekim sonrasında tüplerin üzerine yaklaşık 1 cm kalınlıkta (2 mL) steril katı parafin ya da su agar ilave edilmelidir. Tüpler 35–37 °C'da 24–48 saat süre ile ve tercihen anaerob ortamda inkübe edilir.

-İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesi genellikle tüplerin dip tarafında oluşur. Bakteri gelişmesi görülen tüpler, "mezofil anaerob bakteri pozitif" olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak mezofil anaerob bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Not 1: Fluid Thioglycollate Medium taze hazırlanmalıdır. Eğer tüpteki besiyerinin üstten 1/3'lük bölümünde oksijene bağlı olarak pembe renk oluşmuş ise ve bu renk kaynatma ile kaybolmuyorsa bu besiyeri analizde kullanılamaz. Besiyeri sadece 1 kez kaynatılabilir.

Not 2: Reinforced Clostridial Medium besiyerinde koliform grup bakteriler ve *Staph. aureus* gelişebilir. Gram negatif bakterilerin baskılanması için sterilizasyon sonrası besiyerine 0,02 g/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş Polymyxin B Sulfate çözeltisi ilave edilmelidir.

30.03. Var/Yok Testi

Anaeroblar açısından da "steril" sayılan UHT süt gibi ürünlerde yaygın olarak uygulanır. Bu amaçla Fluid Thioglycollate Medium (Merck 1.08191), Thioglycollate Broth (Merck 1.08190) ya da Reinforced Clostridial Medium (Merck 1.05411) gibi bir selektif ortamda zenginleştirme ve arkasından Reinforced Clostridial Agar (Merck 1.05410) besiyerine ekim yapılır. İnkübasyonlarda standart olarak anaerob ortam önerilir. Var/yok analiz kurallarına uyularak sonuç verilir.

MERCK Anaeroblar

Anaerobic Agar acc. to BREWER	1.05452	500 g
Anaerobic jar (2,5 L)	1.16387	1 adet
Anaeroclip®	1.14226	25 klips
Anaerocult® A	1.13829	10 test
Anaerocult® A mini	1.01611	25 test
Anaerocult® C	1.16275	25 test
Anaerocult® C mini	1.13682	25 test
Anaerocult® IS	1.16819	25 test
Anaerocult® P	1.13807	25 test
Anaerotest®	1.15112	50 strip
Clostridium perfringens Supplement	1.00888	16 vial
Columbia Agar (Base)	1.10455	500 g
Differential Clostridial Agar (DCA) acc. to WEENK	1.10259	500 g
Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM)	1.11699	500 g
Fluid Thioglycollate Medium	1.08191	500 g
Fluid Thioglycollate Medium G	1.16761	500 g
Meat Liver Agar	1.15045	500 g
Reinforced Clostridial Agar	1.05410	500 g
Reinforced Clostridial Medium (RCM)	1.05411	500 g
SPS Agar (Perfringens Selective Agar; ANGELOTTI)	1.10235	500 g
Sulfite Iron Agar, Base	1.10864	500 g
Thioglycollate Broth	1.08190	500 g
TSC Agar (Tryptose Sulfite Cycloserine Agar), Base	1.11972	500 g
TSN Agar (Perfringens Selective Agar; MARSHALL)	1.05264	500 g



31. Lipolitik Bakteriler

31.01. Katı Besiyerinde Sayım 227

Özellikle süt ürünlerinde süt yağını parçalayarak istenmeyen tat ve kokulara neden olan lipolitik bakteriler standart kültürel sayım yöntemi ile belirlenir.

Not: Peynir gibi katı gıdalarda yapılan analizde, lipolitik bakteri sayısının 100 kob/g kadar olduğu bekleniyorsa standart boy 3 Petri kutusuna eşit miktarda yayma ya da doğrudan 14 cm çaplı büyük Petri kutusuna 1 mL yayma yöntemi önerilir. Dökme yöntemi de uygulanabilir.

31.01. Katı Besiyerinde Sayım

Kullanılan Malzeme

¼ Ringer Çözeltilisi (Merck 1.15525)

Tributyryn Agar (Merck 1.01957)

Neutral Tributyrin (Glycerol tributyrat; Merck 1.01958)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-İnkübasyon sonunda (28–30 °C'da 48 saat) Tributyrin Agar besiyerinde etrafı berrak zonlu tüm koloniler lipolitik bakteri olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

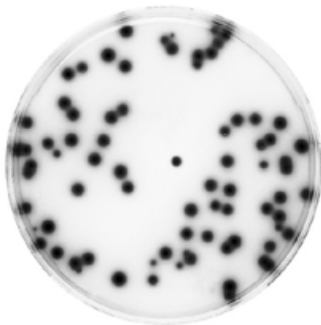
-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

MERCK Envirocheck

Envirocheck® Contact C	1.02136	10 slayt
Envirocheck® Contact DC	1.02147	10 slayt
Envirocheck® Contact E	1.02137	10 slayt
Envirocheck® Contact TVC (Total Viable Counts)	1.02149	10 slayt
Envirocheck® Contact YM (R)	1.02139	10 slayt
Envirocheck® Contact YM (S)	1.02138	10 slayt
Envirocheck® Rodac Blister TVC w/ neutralizers for Total Colony Count	1.07042	6 x 5 Petri
Envirocheck® Rodac Blister Y + M w/ chloramphenicol for yeasts and moulds	1.07044	6 x 5 Petri
Envirocheck® Rodac H + S (Yeasts and moulds)	1.07088	2 x 10 Petri
Envirocheck® Rodac plates (Ø 56 mm) for surface- testing	1.07084	2 x 10 Petri

MERCK Genel Kullanım

Brain Heart Agar	1.13825	500 g
Brain Heart Broth	1.10493	500 g
CASO (Tryptic Soy) Agar	1.05458	500 g
CASO (Tryptic Soy) Broth	1.05459	500 g
Gram Boyama Takımı	1.11885	1 takım
Immersion oil	1.04699	100, 500 mL
Maximum Recovery Diluent	1.12535	500 g
Mini İnkübatör	1.13311	1 adet
Phenol Red Broth Base	1.10987	500 g
Ringer Çözeltisi (¼).....	1.15525	100 tablet
Sterikon; Biyolojik Sterilizasyon İndikatörü	1.10274	15, 100 ampul
Tryptone (İndol) Besiyeri	1.10859	500 g
UV El Lambası	1.13203	1 adet



32. Proteolitik Bakteriler

32 .01. Katı Besiyerinde Sayım 229

Özellikle süt ürünlerinde proteini parçalayarak istenmeyen tat ve kokulara neden olan proteolitik bakteriler standart yayma kültürel sayım yöntemi ile belirlenir.

Not: Peynir gibi katı gıdalarda yapılan analizde, proteolitik bakteri sayısının 100 kob/g kadar olduğu bekleniyorsa standart boy 3 Petri kutusuna yayma ya da doğrudan 14 cm çaplı büyük Petri kutusuna 1 mL yayma yöntemi önerilir.

32.01. Katı Besiyerinde Sayım

Kullanılan Malzeme

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)
Calcium Caseinate Agar (Merck 1.05409)
Skim Milk (Merck 1.15363)
Asetik Asit (Merck 1.00062)

Analiz

- Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.
- Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.
- Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.
- İnkübasyon sonunda (28–30 °C'da 48 saat) Calcium Caseinate Agar besiyerinde etrafı berrak zonlu tüm koloniler proteolitik bakteri olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.
- Zonları belirginleştirmek gerekirse standart boy Petri kutusuna 5 mL asetik asit ilave edilir. Benzer şekilde besiyerine sterilizasyon öncesi 5 g/L yağsız süt tozu (Skim Milk) ilave edilebilir.
- Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

MERCK Besiyerleri; Diğerleri

Vibrio		
TCBS Agar	1.10263	500 g
Aeromonas		
GSP Agar	1.10230	500 g
m-Aeromonas Agar	1.07621	500 g
m-Aeromonas Supplement	1.07625	16 vial
Alicyclobacillus		
BAT Medium	1.07994	500 g
Rop Sporu		
Dextrose Casein-peptone Agar	1.10860	500 g
Nutrient Broth	1.05443	500 g
Proteolitik Bakteriler		
Calcium Caseinate Agar	1.05409	500 g
Plate Count Skim Milk Agar	1.15338	500 g
Lipolitik Bakteriler		
Trybuturin Agar Base	1.01957	500 g
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>		
Bryant & Burkey Agar	1.01617	500 g
Laktobasiller		
MRS Agar	1.10660	500 g
MRS Broth	1.10661	500 g
Rogosa Agar	1.05416	500 g

33. Rop Sporu

33.01. Katı Besiyerinde Sayım	231
33.02. EMS Yöntemi ile Sayım	232

Rop, toprak kökenli olan *Bacillus subtilis* suşlarının gelişmesi ile ekmeklerde görülen bir bozukluktur. Gram pozitif, spor oluşturan çubuk şeklinde bir bakteri olan *B. subtilis* 'in mukoz oluşturan suşları daha önce *B. mesentericus* olarak adlandırılmıştır.

Not 1: Gerek katı gerek sıvı besiyerinde sayılan bakteriler "rop" hastalığı (bozukluğu) etmeni olarak kabul edilir. *B. subtilis* tanımlanması standart gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında yapılmaz.

Not 2: İster katı besiyeri ister EMS yönteminde olsun, ekmek analizlerinde ilk seyreltinin standart 1:9 şeklinde yapılması mümkünse de, unlarda bu oranda yapılan seyreltme sonunda yoğun bir bulamaç elde edilmesi nedeniyle, ilk seyreltmenin 1:19 oranında yapılması ve sayım sonunda bu seyreltinin dikkate alınması gerekmektedir.

Not 3: Rop etmeninin katı besiyerinde sayım yöntemi standart yöntemden farklıdır.

33.01. Katı Besiyerinde Sayım

Kullanılan Malzeme

%0,1 Peptonlu Su
Dextrose Casein–Peptone Agar (Merck 1.10860)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Un örneği 5 gram olarak tartılır ve 95 mL %0,1 peptonlu su içinde 1:19 oranında olacak şekilde homojenize edilir. Ekmek örneği standart şekilde homojenize edilir.

-Daha önceden 250 mL'lik erlenlerde sterilize edilerek hazırlanmış ve 45 °C'da su banyosunda tutulan 100'er mL Dextrose Casein–Peptone Agar besiyerlerine homojenizattan 10 ve 1 mL ekim yapılır.

-Erlenler kaynar su banyosuna konulur ve sürekli karıştırarak, iç sıcaklık 5 dakikada 94 °C'a getirildikten sonra 15 dakika daha aynı derecede ısıtma işlemi uygulanır. Pastörizasyon normu ilgili talimatta belirtilmelidir. Bu süre sonunda erlenler hızla soğutulur ve 5'er adet Petri kutusuna yaklaşık eşit hacimlerde olacak şekilde dağıtılır.

-İnkübasyon sonunda (35–37 °C'da 48 saat) Dextrose Casein–Peptone Agar'da gelişen gri–beyaz renkli, iğ şeklinde (2 ucu sivri) tüm koloniler rop sporu olarak sayılır. 10 mL örnek inoküle edilen erlenden yapılan Petri kutularındaki toplam koloni sayısı doğrudan kob/g olarak spor sayısını verirken, 1 mL örnek inoküle edilen erlenden yapılan Petri kutularındaki toplam koloni sayısı ise 10 ile çarpılarak gramdaki spor sayısı tespit edilir. Bu yöntemle ekmekte 1–15.000 ve unda 2–20.000 kob spor/g düzeyinde sayım yapılabilmektedir.

-Analiz unda yapıldı ise seyreltme oranı dikkate alınarak sonuçlar 2 ile çarpılır.

-Sonuç -standart şekilde hesaplanarak- kob/g olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

33.02. EMS Yöntemi ile Sayım

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

Nutrient Broth (Merck 1.05443)

Analiz

Katı besiyerinde sayım örneğinde olduğu gibi ekmek 1:9 ve un 1:19 oranında homojenize edildikten sonra şahit örnek kullanılarak, materyal 80 °C'da 5 dakika süre ile pastörize edilir ve standart şekilde seyreltmeler yapılır. Pastörizasyon normu ilgili talimatta belirtilmelidir. Homojenizasyon ve seyreltmelerde Maximum Recovery Diluent kullanılır. En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak (bakınız; 07.02. Bölüm) Nutrient Broth tüplerine ekim yapılır. 28 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra bakteri gelişmesine bağlı bulanıklık ve üstte zar oluşumu pozitif olarak değerlendirilir. Rop etmeni belirlenmesinde Nutrient Broth tüplerinin üstünde zar oluşması kritiktir. Bu nedenle sadece bulanıklık değil zar oluşumu da görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak rop sporu sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g olarak verilir. Unda yapılan analizlerde 1:19 seyreltme uyarınca, bulunan sayı 2 ile çarpılır.

34. Laktobasiller

34.01. Katı Besiyerinde Sayım	233
34.02. EMS Yöntemi ile Sayım	234
34.03. Var/yok Testi	235

Laktobasiller başta yoğurt ve peynir olmak üzere süt ürünleri endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmakla birlikte, çeşitli gıdalarda bozulma etmeni olarak ortaya çıkmaktadırlar. Bu bölümde "gıdalarda istenmeyen mikroorganizmalar" olarak analizi verilmiştir. Laktobasil analizinde pek çok besiyeri bulunmakla beraber, MRS Broth ve MRS Agar en fazla kullanılan besiyerleridir.

Uyarı: MRS Broth ve MRS Agar besiyeri laktobasiller için selektif olmakla birlikte, başta *E. coli* olmak üzere diğer bakteriler de bu besiyerlerinde gelişebilirler. Bu nedenle şüpheli durumlarda Gram boyama ve katalaz testi yapılması önerilir. Laktobasiller Gram pozitif, çubuk şeklinde, mikroskopta artarda ya da yan yana zincir formunda görülen, sporsuz ve katalaz negatif bakterilerdir. Her ne kadar *Sporolactobacillus inulinus* spor oluşturan bir bakteri ise de standart gıda analizlerinde dikkate alınmaz.

34.01. Katı Besiyerinde Sayım

Kullanılan Malzeme ve Katkıları

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

MRS Agar (Merck 1.10660)

Gram boyama seti (Merck 1.11885)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-İnkübasyon sonunda (28 °C'da 48 saat) MRS Agar besiyerinde krem renkli, iğ şeklinde (2 ucu sivri) tüm koloniler (bakınız; Ek B 38) laktobasil olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

34.02. EMS Yöntemi ile Sayım

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)

MRS Broth (Merck 1.10661)

MRS Agar (Merck 1.10660)

Gram boyama seti (Merck 1.11885)

Analiz

-Öncelikle "07.02. En Muhtemel Sayı" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak MRS Broth tüplerine ekim yapılır. Gerekirse MRS Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-İnkübasyon sonunda (28 °C'da 24 saat) bakteri gelişmesine bağlı bulanıklık muhtemel laktobasil pozitif olarak işaretlenir.

-Başta *E. coli* olmak üzere diğer bakterilerinde MRS Broth besiyerinde gelişerek gaz oluşturabilmeleri nedeni ile muhtemel pozitif tüplerden MRS Agar besiyerine ekim yapılır. 28 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda krem renkli iğ şeklinde (2 ucu sivri) kolonilerin görülmesi (bakınız; Ek B 38) laktobasil varlığını gösterir. Gerekirse tipik kolonilere Gram boyama, katalaz testi ve morfolojik inceleme yapılır. *Lactobacillus* olduğu belirgin olan Petri kutularına ekimin yapılmış olduğu tüpler pozitif olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak laktobasil sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

34.03. Var/yok Testi

Bu metinde 10 g (mL) gıda örneğinde laktobasillerin var/yok testi ile analizi verilmiştir. 1, 5, 25 g (mL) vb. gibi miktarların analizinde sadece miktar ile orantılı olarak kullanılan besiyeri hacmi değişir. Genel olarak analiz edilen gıdanın 9–10 misli sıvı besiyeri kullanılır.

Kullanılan Malzeme

MRS Agar (Merck 1.10660)
MRS Broth (Merck 1.10661)
Gram boyama seti (Merck 1.11885)
Katalaz testi için Hidrojen Peroksit

Analiz

-Öncelikle "07.08. Var/yok Testleri" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan MRS Broth içinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan bu besiyerlerine eklenir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanıldığında minimum sıvı hacmi uyarınca -örneğin, 25 g gıda + 225 mL broth kullanılma zorunluluğu varsa- homojenizasyon sonrası 10 gram gıda karşılığı olarak 100 mL homojenizat steril erlene alınır.

-Erlen, 28 °C'da 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda erlende bakteri gelişmesi görülürse ya da gelişme olup olmadığı belirgin değilse 9 cm çaplı standart boy Petri kutusuna 1 mL aktarılır, üzerine 15 mL MRS Agar dökülür. Erlen de bakteri gelişmesi olmadığı belirgin ise analize son verilir ve "10 g (mL) örnekte laktobasil yok şeklinde rapor verilir.

-Petri kutusu 28 °C'da 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda MRS Agar besiyerine ekim yapılır. 28 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda krem renkli iğ şeklinde (2 ucu sivri) kolonilerin görülmesi (bakınız; Ek B 38) laktobasil varlığını gösterir. Gerekirse tipik kolonilere Gram boyama, katalaz testi ve morfolojik inceleme yapılır. Sonuç, standart var/yok testi kurallarına göre verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

MERCK Kimyasal Maddeler

Adonitol	1.00846	25 g
amil alkol (n)	1.00975	1 L
Arabinose; L(+).....	1.01492	100 g
Dulcitol	1.05990	50 g
Erythritol; meso	1.03160	25 g
Esculin	1.00842	5 g
Fructose; D(-).....	1.05323	250 g
Galactose; D(+).....	1.04062	50 g
Glucose monohydrate; D(+).....	1.08342	1 kg
Glycerol %87	1.04091	2,5 L
Glycogen	1.04202	1 g
HCl	1.00317	2,5 L
Inositol; myo	1.04728	100 g
Inulin	1.04733	10 g
K ₂ Cr ₂ O ₇	1.04952	250 g
K ₂ HPO ₄ (Anhydrous)	1.05101	1 kg
Katı Parafin	1.07158	1 kg
KH ₂ PO ₄	1.04873	250 g, 1 kg
Kovacs' indol çözeltisi	1.09293	100 mL
Maltose (monohydrate)	1.05910	500 g
Mannitol; D(-)	1.07657	1 kg
NaOH	1.06462	1 kg
Neutral Tributyrin (Glycerol tributyrate)	1.01958	100 mL
para-dimethyl-aminobenzaldehide	8.03057	100, 200 g
Potasyum tellurit trihidrat	1.05164	100 g
Raffinose (pentahydrate)	1.07549	100 g
Rhamnose (monohydrate); L(+).....	1.04736	25 g
Salicin	1.07665	25 g
Sıvı parafin	1.07160	1 L
Sorbitol; D(-).....	1.07758	1 kg
Starch	1.01252	100 g
Sucrose	1.07651	1 kg
Trehalose (dihydrate)	1.08353	5 g
Xylose; D(+).....	1.08689	25 g

35. *Pseudomonas*

35.01. Katı Besiyerinde Sayım 237

Psikrofil/psikrotrof karakterleri ile soğukta tutulan gıdalarda saprofit olarak bozulmalara neden olan, Gram negatif, çubuk şeklinde bakterilerdir. *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonlarının başlıca etmenidir ve bu nedenle klinik mikrobiyolojide oldukça önemlidir. *Pseudomonas* türleri özellikle et ve süt ürünlerinde doğrudan ve/veya kuvvetli proteaz ve lipaz enzimleri ile bozulmalara neden olurlar. UHT sütlerde tatlı pıhtılaşma etmenlerinden birisidir. Çiğ sütün sağımdan UHT'ye işlenmesine kadar geçen süre içinde proteaz enzimlerini salgılar. UHT'ye işleme sırasında bakteri tümüyle ölmekle beraber, proteaz enzimi stabilitesini korur ve zamanla tatlı pıhtılaşma denen bozulmaya neden olur.

Not: *Pseudomonas* cinsine giren 140 tür doğada çok yaygındır. Bunlardan 25 kadarı insanlar için önemlidir. Klinik mikrobiyolojide, klorlanmış havuz suları vb. örneklerde farklı analiz yöntemleri bulunmakla birlikte, bu metinde gıdalardaki analiz yöntemi temel gıda mikrobiyolojisi analiz yaklaşımı ile verilmiştir.

35.01. Katı Besiyerinde Sayım

Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

GSP Agar (Merck 1.10230)

Pseudomonas Selective Agar Base (Cetrimide Agar, Merck 1.05284)

Glycerol %87 (Merck 1.04091)

Analiz

-Öncelikle "07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler" bölümüne bakınız.

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler)den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-GSP Agar besiyerinde 28–30 °C'da 2–3 gün inkübasyon sonunda 2–3 mm çapında mavi–menekşe renkli ve etrafında kırmızı–menekşe renkli zon olan koloniler *Pseudomonas* olarak sayılır. Cetrimide Agar özellikle *Ps. aeruginosa* için kullanılır. Bu besiyerinde 35–37 °C'da 48 saat inkübasyondan sonra sarı yeşil pigmentli (bakınız; Ek B 39) ve uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışığa veren koloniler *Ps. aeruginosa* olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

Orlab
Laboratuvar Market

www.mikrobiyoloji.org

Sipariş Teklif Bütçesel Teklif Hızlı Sipariş

arama içinde geçen ile başlayan ARA

abdurrahman bastas ÇIKIŞ

Sepet Kişisel Bilgiler Sipariş İzleme Yardım

Sepette 0 Çeşit Ürün Var Ofis

Ana Sayfa ORLAB Hakkında Site Kılavuzu Linkler Üreticiler Sorular Erişim

ÜRÜNLER

Tüm Laboratuvar

Tıp Laboratuvarı

Gıda Laboratuvarı

Çevre Laboratuvarı

Kimya Laboratuvarı

Diğer Laboratuvarlar

HİZMETLER

Danışmanlık

Haberler

Yayınlar

Katalog / Broşür

Sık Sorulanlar

Bize Ulaşın

Orlab® Katalog ve Broşür İstek formu

Ad, Soyad

Kurumu

Adres

E- mail

Telefonu

☐ Adet Orlab 2005 Katalog

☐ Adet MERCK ChemDAT CD Besiyerleri ve Kimyasallar

☐ Adet Mikrobiyoloji Broşürü

☐ Adet 2004 Fiyat Listesi

Tamam

© ORLAB

36. İzolasyon ve Tanımlama Esasları

Gıda mikrobiyolojisinde izole edilen bir bakterinin tanımlanması çoğu kez önemlidir. Bir gıda maddesinden izole edilen bakterinin gerçekten *Salmonella* olup olmadığının belirlenmesi gereklidir. Buna göre ürün imha edilebilir ya da güvenli bir şekilde pazarlanabilir.

Ne olduğu hiç bilinmeyen bir izolatın tanımlanması ile belirli bir cins ya da tür olup olmadığının belirlenmesindeki yöntemler ve yaklaşımlar oldukça farklıdır. Örneğin, izolatın *Salmonella* olup olmadığının incelenmesindeki uygulamalar ile izolatın ne olduğunun araştırılmasındaki uygulamalar farklıdır.

Tanımlamada basit ve yaygın olarak morfolojik analizler ve biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Faj tiplendirmesi ve genetik esaslı testler, ancak gelişmiş laboratuvarlarda ve genellikle bilimsel araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Bu kitabın kapsamında sadece basit morfolojik ve biyokimyasal testler verilmiştir.

Morfolojik analizler temel olarak, koloni morfolojisi ve mikroskopik morfoloji olarak 2 şekilde yapılır. Koloni şekli ve büyüklüğü ile basit boyanmış ve Gram boyanmış kültürlerin mikroskopik morfolojisi bazı analizlerde çok önemli olabilmektedir. İzolata doğrudan Gram boyama uygulanarak hem morfolojisi hem de Gram reaksiyonu belirlenebilirse de, prensip olarak morfolojinin belirlenmesi amacıyla basit boyama testi uygulanmalıdır. Bunun nedeni Gram boyamada morfolojilerin yeterince ayrıntılı olarak görülemeyebilmesidir. Burada kastedilen çubuk ve kok farkı değil, pleomorfizm ve kokobasil gibi özel morfolojilerdir. Flagella boyama ile bakterinin hareketli olup olmadığı belirlenebilirse de, yarı katı besiyerinde (yumuşak agar) ya da çukur lamda hareket tespiti daha kolaydır.

Basit biyokimyasal testler genel olarak 3 şekilde yapılır;

-İndol testi örneğinde olduğu gibi sonucu pozitif ve negatif olarak değerlendirilen testler: Tanımlamada en yaygın kullanılan testler bunlardır.

-Belirli bir maddenin hangi derişimine kadar gelişme olduğunun saptanması: Burada değinilen "madde", mutlaka inhibitör olmak zorunda değildir, %50 Glikoz Broth ortamında sadece ozmofilik/ozmotolerant mayalar gelişebilir.

-Koloni rengi, koloni zon rengi, sıvı besiyerinde renk değışimi, floresan ışımaya gibi gözle yapılan değerlendirmeler: Bunlar koloni morfolojisi gibi değil, doğrudan temel biyokimyasal testler olarak değerlendirilir.

Sonucu pozitif ya da negatif olarak alınan testlerdeki değerlendirmeler test edilen bakteri türünün daha önce denenmiş yüzlerce suşu içinde yüzde kaçının bu reaksiyonu pozitif olarak verdiği ile ilişkilidir.

Örneğin, *E. coli* suşlarının %100'ü VP testinde pozitif sonuç verirken, *Citr. freundii* için laktoz testi sonucunda suşların %50'si pozitif; %50'si negatif sonuç vermektedir. Buna göre VP testi pozitif olarak elde edilen bir izolatın *E. coli* olma olasılığı varken, laktoz testi için sonuç ne olursa olsun *Citr. freundii* olup olmadığı konusunda tahminde bulunmak mümkün değildir.

Basit biyokimyasal testlere yönelik değerlendirmeler spektrofotometrik okuma ve bilgisayar destekli programlar ile ya da çoğu uygulamada olduğu gibi gözle yapılır. Nümerik taksonomik yaklaşımlar da tanımlamada her zaman geçerlidir.

Basit biyokimyasal testlerde günlük uygulanan test için pozitif ve negatif sonuç veren 2 bakterinin şahit olarak teste dahil edilmesi, ayrıca aşılammamış bir besiyeri tüpünün ya da Petri kutusunun da şahit olarak denemeye dahil edilmesi gereklidir. Bunun en tipik örneği üre testi için verilmektedir. Üre testi yapılırken, 4 adet Urea Broth besiyeri hazırlanır. Bunlardan birincisine bakteri aşılammaz ve inkübasyon sonunda orijinal portakal kırmızısı renk izlenir (şahit). İkincisine test edilen kültür (test), üçüncüsüne negatif sonuç için *E. coli* ve dördüncüsüne pozitif sonuç için *Proteus* spp. inoküle edilir. Bu 4 tüpün beraberce inkübasyonu ve renk değerlendirilmesi sonucunda test kültürünün üre reaksiyonu belirlenir.

Bu testlerde gereken kültür koleksiyonu uygulaması 09. Bölümde verilmiştir.

Saf Kültür Tekniği

Tanımlanacak kültürün saf olarak elde edilmesi tanımlama testlerine geçmeden önceki en önemli aşamadır. Bir diğer deyiş ile saf kültür elde edilmesi tüm tanımlama testleri öncesinde yapılmış olmalıdır.

Saf kültür, standart bir Petri kutusundaki katı besiyerinde gelişen koloniden elde edilir. Buna izolat da denilir. Saf kültür elde etmek için izolasyon sırasında izole edilecek koloninin yakın çevresinde başka koloni olmamalıdır.

İzolasyonda öze kullanılacak ise kısa saplı olanların tercih edilmesi gerekir. Bunun nedeni el ile daha rahat kullanılabilmesi ve sadece istenen noktaya dokundurma kolaylığıdır. Yaklaşık 5 cm boyunda boş küçük tüplere birer birer olmak kaydı ile kürdan (Japon tipi olarak bilinen) koyulup, pamuklanarak otoklavlanması ile de iyi bir izolasyon gereci elde edilir. Sterilize edilmiş kürdan tüpten çıkartılır, koloniye değdirilir, içinde 2 mL kadar besiyeri bulunan kısa tüplerin içine bırakılır.

Kürdan kullanımında, elle tutulan ucu asla tüpteki besiyerine temas etmemelidir. İkinci olarak kürdan, içinde besiyeri olan tüple birlikte sterilize edilmemelidir. Bunun nedeni tahta kürdanın besiyerini emmesidir.

Eğer krdan ve besiyeri beraberce sterilize edilecekse krdanın besiyerine temas etmemesi sağlanmalıdır.

Test edilen kültürde beklenmedik sonuçlar alınıyorsa öncelikle kültürün saf olup olmadığı kontrol edilmelidir. Örneğin, *Salmonella* kuşkusunu ile selektif bir besiyerinden izole edilen tipik bir koloniye izolasyon aşamasında ya da daha sonra *E. coli* bulaşırsa, uygulanan testler sırasında hem *Salmonella* 'ya hem de *E. coli* 'ye yönelik olarak pozitif sonuçlar alınacaktır.

Bu gibi şüpheli durumlarda kültür paralel olarak hedef mikroorganizma için selektif besiyerine hem de CASO Agar genel bir besiyerine ze ile tek koloni oluşturacak şekilde sürülür, inkübasyona bırakılır. Genel besiyerinde morfolojik olarak farklı koloniler varsa kontaminasyon olduğu açıktır. Kolonilerin hepsi aynı morfolojide ise, bu kontaminasyon olmadığının göstergesi değildir.

Laktoz test sonucunu gösteren selektif besiyerine sürme yapılarak, örneğin, laktoz negatif muhtemel *Salmonella* kolonisi ile laktoz pozitif herhangi bir bakteri (*E. coli*) kolaylıkla ayrılabilse de laktoz negatif olan *Proteus vulgaris* kontaminasyonu bu şekilde ayırt edilemez.

Bu gibi sorunlarla karşılaşmamak için Doğru Laboratuvar Teknikleri (Good Laboratory Practice) uygulamalarına zen gösterilmelidir. Bu konuda 02. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı; Genel Kurallar bölümünde açıklayıcı bilgi bulunmaktadır.

İzolasyonda 1:100 Oranı

Standart Petri kutusundan izolasyon için 100 koloni esas alınır. Bu sayıda standart 1–2 mm çaplı koloni Petri kutusu içinde düzgün olarak dağılmış ise farklı renkteki bir koloni diğerleri içinden kolaylıkla fark edilerek kontaminasyon olmaksızın güvenle izole edilebilir. Bu kural, özellikle 100 renkli koloni içinde 1 renksiz koloni için geçerlidir. 150 renkli koloni içinde 1 renksiz koloninin fark edilerek bunun izolasyonu önemli ölçüde deneyim gerektirir.

Bu durumda, rneğin, *E. coli* O157:H7 analizinde CT–SMAC Agar besiyerinde gelişebilen refakatçi floradan renkli koloni oluşturanlar, renksiz koloni oluşturan *E. coli* O157:H7'nin varlığını maskeleyebilir ve sonuç "*E. coli* O157 serotipi yoktur" şeklinde sahte negatif olarak alınabilir.

Bu şekilde sahte negatif sonuçlar gıda sanayisinde yapılan analizlerde -özellikle katı besiyeri selektivitesindeki yetersizliğe bağlı olarak- sıklıkla alınmaktadır.

Refakatçi flora baskılanmasına yönelik olarak yapılacak uygulamaların büyük çoğunluğunun hedef mikroorganizmayı da etkileyeceği açıktır. Halofil, ozmofil, termofil vb. grupların analizinde sadece hedef mikroorganizmanın bu özelliği ile refakatçi flora baskılanmaktadır. Örneğin, ozmofil maya analizinde (bakınız; 17.03. Bölüm) %50 glikoz konsantrasyonu zaten bu grubun gelişimi için gerekli iken, refakatçi floranın bu derişimdeki glikozda gelişimi tümüyle mümkün değildir.

Bu örnek tümüyle sıra dışı olup, çok ender birkaç mikroorganizma için geçerlidir. Oysa, gıda mikrobiyolojisindeki analizlerin büyük çoğunda hedef mikroorganizma analizi sırasında refakatçi flora baskılanması önemli ölçüde görülür. Çok tipik bir örnek olmak üzere *Listeria* analizinde laktobasiller gerek zenginleştirme gerek selektif katı besiyerinde gelişebilirler.

Selektif zenginleştirme aşamasında ya da selektif katı besiyerinde refakatçi floranın baskılanması, besiyeri geliştirme çalışmalarının temellerinden birisidir.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde sahte negatif sonuçlardan olabildiğince kaçınmak için, özellikle yoğun refakatçi flora varlığı olan gıdalardaki patojen analizlerinin Singlepath kitleri ile yapılması ayrı bir önem taşımaktadır.

kimyaevi.org FORUM mikrobiyoloji.org

ana sayfa site hakkında arama site haritası linkler istek ve öneri

Üyelik
Kullanıcı:
şifre:
... Üye Ol ... Tamam
Şifremini Unuttum.

Kimya Dünyası
...Analitik Kimya
...Anorganik Kimya
...Fizikokimya
...Genel Kimya
...Polimer Kimyası
...Organik Kimya
...Çevre Kimyası
...Enstrümental Analiz
...Gıda Kimyası
...Ambalaj

Uygulamalar
...Gıda Uygulamaları
...Yem Ürünleri Uyg.
...Temizlik
Maddelerinde
Yapılan Analizler
...Titrimetrik Yöntem
...Karl Fischer
...Kurutucular
...Su Kimyası

Yayınlar
...Kitaplar
...Dergiler
...Tezler
...DOST SİTELER
...İLGİLİ FİRMALAR

Kimya Evine Hoşgeldiniz...
Bu alana reklam verebilirsiniz.

Çözelti Hazırlanması
Çözelti hazırlığı ilgili ne varsa tıklayın...
Tampon Hazırlanması

Gerekli Tablolar
İndikatör Hazırlanması
İndikatörler hakkında bilgiler

Sizden Gelenler
Hızlı Test Kitleri
Havuz, kazan, içme suları, çevre, gıda ve tarım

Laboratuvar Güvenliği
Laboratuvar Güvenliği ile ilgili tüm bilgiler için tıklayın...

Kimyasal Etiketleri
Kimyasalların özelliklerini öğrenmek için tıklayın.
Kimyasalların güvenlik sertifikaları için tıklayın.

Pratik Bilgiler
Günlük hayatta ihtiyacınız olan pratik bilgiler...

Hızlı Volumetrik Çözeltiler
Derişimi tam olarak bilinen Merck volumetrik çözeltiler

Merak Ettikleriniz
Merak edilen konularda cevaplar...

Temel Terimler
Deney Öncesi Hazırlık
Bir deneye başlamadan önce ne yapmalı, tıklayın...

Haberler
Gıda ile ilgili Yeni Tebliğ ve Yönetmelikler
IV. GAP Tarım Kongresi 21-23 EYLÜL 2005 Şanlıurfa
4. Gıda Mühendisliği Kongresi 29 Eylül 1 Ekim 2005 ANKARA
XIV. ULUSAL KİMYA KONGRESİ
Elementler
Birim Çevrim Tablosu
Periyodik Tablo
Günlük Kimya Bilgi Bankası
Ziyaretçi: 335594.
Online: 9 kişi.

37. Basit Biyokimyasal Testler

37.01. İndol Testi	243
37.02. Katalaz Testi	245
37.03. Oksidaz Testi	246
37.04. Metil Red Testi	246
37.05. Voges Proskauer (VP) Testi	247
37.06. Sitrat Testi	248
37.07. Karbohidrat Testleri	248
37.08. Gaz Oluşturma Testleri	249
37.09. Lisin Dekarboksilaz Testi	250
37.10. Hidrojen Sülfür Oluşumu	250
37.11. Hareket Testi (besiyerinde)	251
37.12. Urease Testi	252
37.13. Hemoliz Testi	252
37.14. Koagülaz Testi	252

37.01. İndol Testi

Biyokimyasal testlerin genel ilkesi ve yaklaşımı bu bölümde verilmiştir.

Bazı bakteriler triptofanaz enzim aktivitelerine bağlı olarak besiyerinde bulunan triptofan amino asidinden indol oluşturur. Dolayısı ile testin doğru adı, triptofanaz enzimine bağlı olarak "triptofandan indol oluşumu" olmakla birlikte, basitçe ve yaygın olarak indol testi şeklinde kullanılır. Aslında burada belirlenen, triptofanaz enzimin varlığıdır.

Daha önce yapılmış araştırmalara göre *E. coli* suşlarının %98'i triptofanaz enzimi varlığına bağlı olarak indol testinde pozitif sonuç verirken, *Citr. freundii* suşlarının sadece %5'i bu testte pozitif sonuç vermektedir. Buna göre; izolata uygulanan indol testi sonucunda elde edilen pozitif reaksiyon, çok düşük bir olasılıkla *Citr. freundii* ve negatif sonuç da çok düşük bir olasılıkla *E. coli* 'ye ait olabilir.

Triptofan amino asidi, belirli bakteriler tarafından okside edilerek; indol, indol asetik asit ve skatol (metil indol) olmak üzere indolik metabolitlere dönüşür. Triptofanın, intraselüler bir enzim olan triptofanaz ile parçalanmasında temel ara ürün indol pürivik asittir. Bunun deaminasyonu ile indol ve dekarboksilasyonu ile skatol meydana gelir.

Triptofanaz enzim varlığına bağlı olarak oluşan indol, basit olarak besiyerine Kovacs' indol ayırıcı damlatılarak belirlenir. Kovacs' indol ayırıcının bileşimi; 5 g para-dimethylaminobenzaldehyde, 75 mL n-amil alkol, 25 mL konsantre HCl şeklindedir.

Bu ayıraç, ticari olarak hazırlanmış preparat olarak sağlanabileceği gibi (Merck 1.109293), laboratuvarında formülden de hazırlanabilir. Bu amaçla 5 gram para-dimethyl-aminobenzaldehyde (Merck 8.03057), 75 mL n-amil alkolde (Merck 1.00975) eritilip üzerine yavaşça 25 mL konsantre HCl (Merck 1.00317) ilave edilir.

İndol testi genel olarak sıvı besiyerinde yapılır. Bu amaçla en yaygın olarak ve uluslararası standartlara göre kullanılan Tryptone Water (Merck 1.10859) besiyeridir. SIM (Sulphure, Indole, Motility Medium; Merck 1.05470) gibi yarı katı besiyerlerinde indol testi yapılması mümkün ise de, pratik kullanımda fazlaca değer bulmamıştır. Oysa, bu besiyeri bilimsel araştırmalarda yoğun şekilde kullanılmaktadır. Buna karşın, *E. coli* analizinde kullanılan Fluorocult LST Broth (Merck 1.12588), ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298) gibi besiyerlerinde bileşimdeki triptofan nedeni ile doğrudan indol testi yapılabilir.

İndol testi uygulanacak olan izolat 5 mL Tryptone Water (Merck 1.10859) besiyerine inoküle edilir, uygun sıcaklıkta 24 saat inkübasyon sonunda kültür üzerine 0,5 mL kadar Kovacs' indol çözeltisi ilave edilip, tüp elle karıştırılır. En geç 2 dakika içinde tüpün üzerinde vişne çürüğü renkli bir halka görülmesi halinde indol testi pozitif olarak değerlendirilir. Bu test, ReadyCult Coliforms besiyerinde yapıldığında besiyeri miktarına bağlı olarak kullanılacak Kovacs' indol çözeltisi miktarı orantılı olarak değişir.

İndol testinde temel yaklaşım aşağıda özetlenmiştir.

-Fluorocult LST Broth (Merck 1.12588) besiyerinde triptofan vardır. Dolayısı ile bu besiyerinde indol testi yapılabilir.

-İzolatın *E. coli* olup olmadığı kontrol edilmek isteniyor ise içinde Durham tüpü olan Fluorocult LST Broth besiyerine inoküle edilir. 37 °C (hatta 45 °C) sıcaklıkta 24 saat inkübasyon sonunda tüpte gelişme ve Durham tüpünde gaz varsa izolatın *E. coli* olma olasılığı vardır. İnkübasyon 45 °C'da yapıldı ise bu olasılık çok yüksektir.

-Besiyerinde gelişen kültür uzun dalga boylu UV ışık altında (Merck 1.13203) floresan ışımaya açısından kontrol edilir. İnkübasyon sıcaklığı ne olursa olsun floresan pozitif sonuç pratik olarak *E. coli* 'yi gösterir. Bu koşulda Durham tüpünde gaz oluşumunun kontrolü gerekli değildir. İnkübasyon 45 °C'da yapıldı ve floresan pozitif sonuç alındı ise izolatın *E. coli* olduğu kesindir, indol testi gerekli değildir.

-İzolat 37 °C'da inkübe edildi ve floresan testi pozitif ancak gaz testi değerlendirilemiyor ise sonuç çok büyük olasılıkla *E. coli* 'dir. Bazı *Salmonella* ve *Shigella* serotiplerinin de floresan pozitif sonuç verdiği bilinmektedir. Bu durumda indol testi uygulanması gerekir. Floresan ve indol pozitif tek bakteri *E. coli* 'dir.

-*E. coli* analizinde gıdada bazı *Salmonella* ve *Shigella* serotiplerinin varlığına rağmen, bunların indol testi sonucunda "*E. coli* değil" şeklinde değerlendirilmesi ayrı bir sorgulama konusudur.

-İzolatin *E. coli* olup olmadığının değerlendirilmesi dışında sadece indol testi yapılacak ise, Fluorocult LST Broth besiyeri kullanmanın çok pahalıya geleceği göz önüne alınmalıdır. Bununla birlikte, laboratuvarıda Tryptone Water besiyeri yoksa ve indol testi çok yoğun olarak kullanılmıyor ise bu koşulda Fluorocult LST Broth besiyerinin bu amaçla kullanılması daha ekonomik olur.

İndol testi için pozitif şahit olarak *E. coli*, negatif şahit olarak *Enterobacter aerogenes* kullanılır.

Not 1: İndol testi uygulanan kültürden reizolasyon yapılamaz. Kovacs' indol çözeltisi içinde bulunan maddeler tüp içindeki kültüre önemli ölçüde zarar verir. Kuşkuyla bir durum varsa, indol testi öncesinde kültürden steril boş bir tüpe en az 0,5 mL kadar aktarılması önerilir.

Not 2: İndol testi uygulanmış tüplere otoklavda sterilizasyon uygulanmaz. Aksi halde Kovacs' indol çözeltisi bileşimindeki maddelerin buharı, gerek insan sağlığına gerek otoklava zarar verir. İndol testi uygulanmış tüplerin 1 gece kendi halinde bekletilmesi ile bir anlamda kimyasal sterilizasyon sağlanır. Aşağıdaki paragrafta belirtildiği şekilde tüplere NaOH ilave edildiyse tüpleri çeker ocak altında kaynar su banyosunda 30 dakika tutmak yeterli olur.

Not 3: Kültürde aşırı asit gelişimine bağlı olarak Fluorocult besiyerlerinde floresan testi kesin olarak değerlendirilemeyebilir. Yüksek asitlik, floresan ışımayı maskeler. 10 mL besiyerine 1 N NaOH çözeltisinden 1 mL ilave edilir, tüp iyice karıştırılır ve floresan testi yeniden yapılır. NaOH ilave edilmiş bu tüplerde indol testi uygulanmasının indol testi açısından bir yararı ya da zararı yoktur. Bir diğer deyiş ile NaOH ilavesi indol testini etkilemez.

37.02. Katalaz Testi

Katalaz testi olarak adlandırılan bu test, bakterilerde katalaz enziminin varlığı ya da yokluğunu gösterir.

Testin yapılışında önerilen besiyeri Nutrient Agar (Merck 1.05450) olmakla birlikte, Plate Count Agar (Merck 1.05463), CASO (Tryptic Soy) Agar (Merck 1.05458) gibi genel besiyerleri de bu amaçla kullanılabilir. Tüpte yatık agara ya da Petri kutusundaki agara öze ile sürme yapılır, 18–24 saat inkübasyondan sonra ya doğrudan koloni üzerine mikro pipetle %3 konsantrasyonlu hidrojen peroksit damlatılır ya da yatık agar tüpündeki yüzey kültürüne aynı çözeltiden 1 mL eklenir.

Gerekirse lam üzerine 1 damla hidrojen peroksit damlatılır, koloni bu damla içinde hızla homojenize edilir. Katalaz testi için %3 konsantrasyonda hazırlanmış Bactident Catalase (Merck 1.11351) kullanılabilir.

Tüm uygulamalarda en geç 1 dakika içinde gözle görülür gaz çıkışı olursa katalaz testi sonucu pozitif olarak değerlendirilir. Lamda yapılan test sonucu kolay gözlemlenmeyebilir. Bu amaçla büyüteç kullanılabilir.

Katalaz testinde pozitif şahit olarak *Bacillus* spp., negatif şahit olarak *Lactobacillus* spp. kullanılabilir.

37.03. Oksidaz Testi

Aerob bakterilerde bulunan oksidaz enziminin (sitokrom C oksidaz) varlığını belirlemek için yapılır. Anaerobik bakterilerde ve Enterobacteriaceae familyası üyelerinde oksidaz enzimi yoktur. Genellikle *Pseudomonas* 'ları Enterobacteriaceae üyelerinden ayırmak için kullanılır.

Metodun uygulanışı doğrudan Bactident Oxidase (Merck 1.13300) ile yapılabilir. Bu amaçla koloni 1 mL kadar saf suda yoğun bir şekilde çözülür, test şeridinin reaksiyon bölmesine öze ile aktarılır. 60 saniye içinde mavi–menekşe renk dönüşümü oksidaz testinin pozitif sonuç verdiğini gösterir.

Test, laboratuvarında hazırlanan çözelti ile de yapılabilir. Bu amaçla 1 g tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür (Merck 8.21101) 100 mL damıtık suda çözülür. Denemelerde taze hazırlanmış çözelti kullanılmalıdır. Hazırlanmış çözelti buzdolabında 7 güne kadar saklanabilir. Bir parça filtre kağıdı bu çözelti ile ıslatılır. Bu ıslatma sırasında sahte pozitif sonuçtan sakınmak için filtre kağıdının mavi renk vermiyor olmasına dikkat edilmelidir. Temiz bir platin öze yardımıyla aktif kültürden bir miktar alınarak filtre kağıdının üzerine yayılır. 10 saniye içinde gözlenen mavi renk oluşumu oksidaz pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Yaşlı kültürlerle yapılan test güvenilir sonuç vermemektedir.

Oksidaz testi için pozitif şahit olarak *Pseudomonas* spp., negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

37.04. Metil Red Testi

Bazı bakteriler glikozu kullanarak fazla miktarda asit oluştururlar ve ortamın pH'sını 4,4'ün altına düşürürler.

Bazı bakteriler ise daha az asit oluştururlar ve pH değerinde büyük bir düşme sağlamazlar. Bu farklılık bir pH indikatörü olan metil red indikatörü kullanılarak gözlenir.

Test genel olarak, MR-VP Broth (Merck 1.05712) besiyerinde yapılır. 5 mL besiyerine 18 saatlik aktif kültürden ze ile aşılama yapılır ve uygun sıcaklıkta 96 saate kadar inkübe edilir. İnkübasyonun 48. saatinde bu besiyerinden alınan 1 mL kültürde VP testi yapılır, tp metil red testi için inkübasyona devam ettirilir. Bununla beraber, günlük uygulamada 48 saatlik inkübasyon sonunda besiyerinden alınan bir miktar örnek üzerinde metil red testi yapılır, pozitif sonuç alınırsa test bitirilir, negatif sonuç için inkübasyona devam edilir.

Metil red indikatörü laboratuvarıda hazırlanır. 0,1 g metil red (Merck 1.06076) 300 mL %95'lik etil alkolde çözülür ve 500 mL'ye damıtık su ile tamamlanır.

İnkübasyon sonunda her 1 mL kültür zerine Pastör pipeti ile için 1 damla metil red indikatörü damlatılır. Rengin kırmızıya dönüşmesi, bu test sonucunun pozitif olduğunu gösterir. Metil red indikatörü pH 4,4 altında kırmızı ve pH 5,1 üzerinde sarı renk verir. Kültürün pH'sına bakılarak da asitlik hakkında bilgi edinmek mümkündür. Ancak bu amaçla pH metre kullanımından -olası kontaminasyon ve/veya dekontaminasyon sırasında elektrotun yıpranması nedeniyle- olabildiğince kaçınılmalıdır. pH kağıdı kullanmak ise, ancak uygun skalada pH kağıdı ile yapılabilir. Bu şekilde pH 4,4 ve altındaki değerler metil red test sonucu pozitif olarak değerlendirilir.

Metil red testi için pozitif şahit olarak *E. coli*, negatif şahit olarak *Enterobacter aerogenes* kullanılabilir.

37.05. Voges Proskauer (VP) Testi

Test yaygın olarak MR–VP Broth (Merck 1.05712) besiyerinde yapılır. 5 mL besiyerine 18 saatlik aktif kültürden ze ile aşılama yapılır ve uygun sıcaklıkta 96 saate kadar inkübe edilir. İnkübasyonun 48. saatinde bu besiyerinden alınan 1 mL kültürde VP testi yapılır, kalanı 37.04. Metil Red testinde belirtildiği gibi kullanılır.

O'meara (potasyum hidroksit) zeltisi hazırlamak için 40 g KOH damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanır. Bu zelti buzdolabında 4 hafta depolanabilir. Barrit (α naphtol çözeltisi) hazırlamak için 0,5 g α Naphtol 10 mL mutlak (absolute) etil alkolde çözündürülür. Her testte taze olarak hazırlanmalıdır.

48 saatlik MR–VP kültüründen 1 mL 13x100 mm'lik küçük test tüpüne aktarılır, üzerine 0,6 mL α naphtol çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır.

Bunun üzerine 0,2 mL %40 KOH çözeltisinden ilave edilir ve karıştırılır. 4 saat sonra sonuçlar değerlendirilir. Vişne çürüğü renk oluşumu pozitif reaksiyondur.

VP testinde pozitif şahit olarak *Enterobacter aerogenes*, negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

37.06. Sitrat Testi

Sitratin tek karbon kaynağı olarak kullanılıp, kullanılmadığının belirlenmesi için yapılan testtir. Pozitif reaksiyonda besiyerinde oluşan alkali reaksiyon sonucu bromothymol blue indikatörünün rengi yeşilden koyu maviye dönüşür.

Test tüplerinde yatık agar olarak hazırlanmış Simmons Citrate Agar besiyerine aktif kültürden platin aşı iğnesi kullanılarak yüzeye inokülasyon ve 48 saat sonunda tüpün renginin incelenmesi ile yapılır. Besiyeri renginin koyu maviye dönüşmesi pozitif, orijinal yeşil renkte kalması negatif sonuç olarak değerlendirilir.

Sitrat testinde pozitif şahit olarak *Enterobacter aerogenes*, negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

37.07. Karbohidrat Testleri

Mikroorganizmalar çeşitli enzimlerin varlığına bağlı olarak karbohidratları karbon kaynağı olarak kullanabilir ya da kullanamaz. Bu özellikleri nedeniyle karbohidrat testleri bakterilerin tanımlanmalarında sıklıkla kullanılır.

Belirli bir karbohidratın karbon kaynağı olarak kullanılması sonunda asidik ürünler ortaya çıkar. Oluşan bu asitlik basit olarak pH indikatörünün renk değiştirmesi ile belirlenir. pH indikatörü 37.04. Metil Red testi bölümünde anlatıldığı şekilde inkübasyon sonunda kültüre ilave edilebileceği gibi, doğrudan ve yaygın olarak besiyeri bünyesinde de yer alabilir.

Karbohidratlardan asit oluşturma testleri yaygın olarak şeker testleri olarak da anılır. Ancak sorbitol, mannitol gibi şeker alkollerin de bu testlerde kullanıldığı göz önünde tutulmalıdır.

Bu testler basit olarak bileşiminde pepton, test edilecek karbohidrat ve pH indikatörü olan besiyerlerinde yapılır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan Phenol Red Broth Base besiyeridir. Yöntemin uygulanışı "40.05. Phenol Red Broth Base" başlığı altında verilmiştir.

Dikkat edilmesi gereken konu düşük karbohidrat konsantrasyonuna bağılı sahte negatif sonuçlardır. Bazı bakterilerin karbohidratları kullanma aktivitelerinin yanı sıra, proteolitik aktiviteleri de çok yüksektir. Bunlar karbohidratları çok kısa bir sürede kullanarak besiyeri pH'sını hızla düşürürler ve pH indikatörü olan fenol red nedeniyle kırmızı olan besiyeri rengi sarıya döner. Karbohidratın tükenmesinden sonra, bakteri karbon kaynağı olarak besiyeri bileşimindeki peptonları kullanmaya başlar ve bu kez alkali ürünlerin oluşumu nedeni ile pH yükselir ve renk tekrar kırmızıya döner. Bu sahte negatif sonuçlardan sakınmak için karbohidrat fermentasyon testlerinde reaksiyon sık sık kontrol edilmelidir ya da test edilen karbohidrat %1 konsantrasyonda tutulmalıdır. Testlerde kullanılan karbohidratların Merck kodları ve ambalaj boyutları aşağıda verilmiştir:

Adonitol 1.00846 25 g; L(+)-Arabinose 1.01492 100 g; Dulcitol 1.05990 50 g; Esculin 1.00842 5 g; D(-)-Fructose 1.05323 250 g; D(+)-Galactose 1.04062 50 g; D(+)-Glucose monohydrate 1.08342 1 kg; Glycerol (about 87 %) 1.04094 500 mL; Glycogen 1.04202 1 g; Inulin 1.04733 10 g; D(-)-Mannitol 1.07657 1 kg; Maltose (monohydrate) 1.05910 500 g; meso-Erythritol 1.03160 25 g; myo-Inositol 1.04728 100 g; Raffinose (pentahydrate) 1.07549 100 g; L(+)-Rhamnose (monohydrate) 1.04736 25 g; Salicin 1.07665 25 g; D(-)-Sorbitol 1.07758 1 kg; Starch 1.01252 100 g, Sucrose 1.07651 1 kg; Trehalose (dihydrate) 1.08353 5 g; D(+)-Xylose 1.08689 25 g.

Karbohidrat testleri bu şekli ile kullanıldığı gibi, VRB Agar, VRBD Agar, Triple Sugar Iron Agar, Sorbitol MacConkey Agar ve Kligler Iron Agar gibi besiyerleri de bir anlamda karbohidratların kullanımı üzerine tanımlama ya da selektif izolasyon ve/veya sayım amacıyla geliştirilmişlerdir. Örneğin VRB Agar besiyerinde, laktozu kullanabilen koliform grup bakteriler laktozdan asit oluşturmakta ve oluşan bu asitlik pH indikatörü ile koloninin koyu kırmızı renk almasına neden olmaktadır (bakınız, 42.01. VRB Agar). Triple Sugar Iron Agar sadece *Salmonella* tanımlanmasında kullanılan bir besiyeri olup, test edilen bakterinin laktoz ve sakkaroz negatif, glikoz pozitif olup olmadığının belirlenmesi için kullanılır (bakınız; 49.10. ve 19.02. Bölüm). Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar besiyeri ise *E. coli* O157: H7 analizinde kullanılır. Sorbitol negatif olan *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitolü kullanıp asit oluşturamadığı için renksiz koloniler yapar (bakınız; 15.01. Bölüm).

37.08. Gaz Oluşturma Testleri

Koliform grup bakterilerin laktozdan gaz oluşturmaları tipik bir reaksiyondur. Buna göre içine Durham tüpü atılmış LST Broth tüplerinde inkübasyondan sonra Durham tüplerinde gaz birikmesi olursa laktozdan gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.

Triple Sugar Iron Agar besiyerinde *Salmonella* tipik olarak glikozdan gaz oluşturur ve bu durum besiyerinde gaz yarıkları ile belirlenir.

37.09. Lysin Dekarboksilaz Testi

Lysin dekarboksilaz (LDC) enziminin varlığı ya da yokluğu bakteriler için tipiktir. Test basit olarak Lysine Iron Agar besiyeri kullanılarak yapılır.

Lysin, LDC pozitif bakteriler (*Salmonella*) tarafından kadeverine çevrilir. Bu reaksiyon pH indikatörünün menekşe renk almasına neden olur. Reaksiyon pH 6'dan daha düşük asit ortamda gerçekleşir. Bu nedenle önce glikoz fermantasyonu sonucu ortam asitlenir. Dolayısı ile bu besiyeri glikozu fermente edebilen bakterilerin LDC enzimi varlığını belirlemek için kullanılabilir. LDC enzimi olmayan bakterilerde besiyeri rengi sarı olarak kalır, ancak inkübasyonun uzaması halinde alkalinizasyon gerçekleşerek sahte pozitif sonuçlar alınabilir. Bu nedenle inkübasyon süresi 24 saati geçmemelidir. Birkaç *Proteus morganii* suşu hariç olmak üzere *Proteus* ve *Providencia* ise lisini α -ketocarboxylic asit oluşacak şekilde deamine eder. Bu bileşik ise yüzeyin hemen altında oksijen etkisi ile demirle reaksiyona girerek kırmızımsı kahverengi bir bileşik oluşturur.

Lysin dekarboksilaz testinde pozitif şahit olarak *E. coli* veya *Salmonella* spp., negatif şahit olarak *Citrobacter freundii* kullanılabilir.

37.10. Hidrojen Sülfür Oluşumu

Salmonella analizinde tipik reaksiyonlardan birisidir. Bakterilerin sistin, sistein gibi kükürt içeren aminoasitlerden ya da sülfatlardan H_2S oluşturup oluşturamadıkları bu test ile belirlenir. Bakterilerin oluşturduğu H_2S , besiyeri bileşimindeki demir ile birleşerek siyah renkli demir sülfüre dönüşür. Buna göre besiyeri renginin siyaha dönüşmesi H_2S oluşturulduğunu gösterir.

Bu test sadece *Salmonella* için değil, aynı zamanda diğer pek çok bakterinin tanımlanmasında kullanılan basit bir testtir. Triple Sugar Iron Agar besiyeri (bakınız; 49.10. Bölüm) sadece *Salmonella* analizi için geliştirilmiş olmakla beraber, diğer reaksiyonlara bakılmaksızın sadece bu test için kullanılabilir. H_2S testi, Kligler Iron Agar ve SIM Medium gibi besiyerlerinde de yapılabilir.

H_2S testinde pozitif şahit olarak *Salmonella* spp., negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

37.11. Hareket Testi (Besiyerinde)

Bakterilerin hareketli olup, olmadıklarının belirlenmesi 3 şekilde saptanabilir. Bunlar, yarı katı besiyerinde hareket testi, mikroskopta asılı damla ile hareket testi ve flagella boyama testidir. Yarı katı besiyerinde hareket testi bu bölümde, mikroskopta asılı damla testi aşağıda 38.03. Bölümde açıklanmıştır. Flagella boyama yöntemi günlük uygulamada kullanılmaz. Basit olarak bu testte bakterilerde flagella boyanır, mikroskopik incelemede flagella görülürse hareket testinin pozitif olduğuna karar verilir.

Besiyerinde hareket testi prensip olarak yarı katı besiyerinde yapılır. Agar miktarı, besiyeri pH'sı ve agarın jelleşme yeteneğine göre değişmek üzere %0,2–0,3 olarak hazırlanan besiyerleri "yarı katı" olarak tanımlanır. Sıvı besiyerinde bakteri ister hareketli, ister hareketsiz olsun tüm besiyerinde yeknesak bir bulanıklık yapar. Tersine olarak, standart katı besiyerinde koloni; hareketin engellenmesi ile oluşur. Başta *Bacillus* türleri olmak üzere bazı bakteriler aşırı hareket ile tüm yüzeyi kaplayacak şekilde koloni oluştururlar ise de, yayılma göstermeyen bakteri kolonilerinin hareketsiz olduğu söylenemez.

Oysa yarı katı besiyerinde tüpün aşı iğnesi kullanılarak bir defada, besiyerinin tam ortasından ve dik olarak inoküle edilmesi ve inkübasyon sonunda tüpteki gelişmenin incelenmesi ile bakterinin hareketli olup olmadığı test edilebilir. Basit olarak inkübasyon sonunda gelişme tüm besiyerinde olursa hareket pozitif, sadece aşılama hattı boyunca olursa hareket negatif olarak değerlendirilir.

Hareket testinde pozitif ve negatif şahit kullanımı diğer testlerdeki pozitif ve negatif şahit kullanmaya göre daha önemlidir. Pozitif şahit olarak *E. coli*, negatif şahit olarak *Klebsiella pneumoniae* kullanılabilir.

Bu test esas olarak flagella varlığının belirlenmesi değil, hareketin gösterilmesi üzerine kurulmuştur. Flagella varlığı her zaman hareketi ortaya koymaz. Örneğin besiyerinde hareket testi ile yapılan analizde flagellaya sahip *Yersinia* türleri 25 °C'da hareket pozitif, 37 °C'da hareket negatif sonuç verir. Benzer durum *Listeria* için de geçerlidir. Bu nedenle Singlepath *Listeria* kiti ile analiz edilecek kültür 25–28 °C'da inkübe edilir.

Test basit olarak CASO Broth, Nutrient Broth gibi genel sıvı besiyerlerine %0,25 oranında agar ilave edilerek hazırlanan yarı katı besiyerlerinde yapılabileceği gibi, SIM Medium gibi doğrudan bu amaca yönelik olarak geliştirilmiş besiyerlerinde de yapılabilir.

37.12. Urease Testi

Bakterilerin üreyi hidrolize eden urease enzimini saptamak amacıyla yapılır. Bu test esas olarak *Salmonella* ile selektif besiyerlerinde *Salmonella* serotiplerine benzer koloni morfolojisi gösteren *Proteus* türlerinin ayrılması için kullanılır.

Yukarıda "19.02. *Salmonella* tanımlanması" ve aşağıda "49.13. Urease Broth" bölümlerinde bu test ile ilgili açıklama bulunmaktadır.

37.13. Hemoliz Testi

Kandaki hemoglobin, bakterilerdeki farklı hemolizin enzimleri ile farklı şekillerde parçalanır. Bu enzimlerin varlığı standart olarak Kanlı Agar (Blood Agar) besiyerinde belirlenir. Buna göre; α , β ve γ olmak üzere 3 tip hemoliz vardır. α -hemolizde koloni etrafında tam bir parçalanma yoktur. Kan kısmen parçalanmıştır, zonun 1/3 kadarı yeşil bir renk alır. Zon tam belirgin değildir. β -hemolizde hemoglobinin tam parçalanmasına bağlı olarak belirgin saydam bir zon oluşur. γ -hemoliz olarak tanımlanan sonuç ise hemoliz olmadığını belirtir. Koloni etrafında zon meydana gelmez.

Kanlı Agar hazırlanmasında temel olarak defibrine koyun kanı kullanılır (bakınız; 40.06. Bölüm).

37.14. Koagülaz Testi

Özellikle stafilokoklar için yapılan bir testtir. Bu bakterilerde bulunan koagülaz enzimi kan plazmasını pıhtılaştırır. Çok genel bir yaklaşım ile koagülaz enzimine sahip olan stafilokokların patojen olduğuna karar verilir. Diğer bir yaklaşım ile, selektif bir katı besiyerinden izole edilen ve *Staph. aureus* olduğundan kuşku duyulan, mikroskopik morfolojisi de stafilokok olan izolat, koagülaz pozitif sonuç verirse bunun *Staph. aureus* olduğuna karar verilir. Bununla birlikte, koagülaz negatif *Staph. aureus* suşları da vardır ve koagülaz varlığı ile patojenite arasındaki ilişki tartışma konusudur.

Koagülaz testi çok yaygın olarak tüpte yapılır. Yöntem, 48.03. bölümde ayrıntılı olarak verilmiştir.

38. Mikroskopik Tanımlama

38.01. Basit Boyama	253
38.02. Gram Boyama	254
38.03. Hareket Testi (Asılı Damla)	254

Mikroskopik tanımlamalar özellikle klinik mikrobiyolojide oldukça önemli iken, gıda sanayisinde günlük analiz yapan laboratuvarlarda aynı öneme sahip değildir. Bunun başlıca nedeni, klinik mikrobiyolojide materyalin genellikle Kanlı Agar gibi zengin bir besiyerine sürülmesi ve izolatın bu şekilde genel bir besiyerinden elde edilmesi, buna karşın gıda mikrobiyolojisinde izolatın genellikle selektif bir besiyerinden elde edilmesidir. Örneğin, VRB Agar besiyerinden elde edilen tipik koloni zaten Gram negatif çubuk şeklinde bir bakteri olacaktır. Plate Count Agar'da gelişen bakterinin tanımlanması ise ancak çok özel koşullarda yapılır. Gıda mikrobiyolojisi araştırma laboratuvarlarında mikroskopik tanımlamanın yeri vardır.

38.01. Basit Boyama

İşlem başlıca lam üzerine aktarma ve yayma, kurutma, fiksasyon, boyama, yıkama, kurutma ve mikroskopta inceleme aşamalarından oluşur. Temel olarak morfolojik inceleme için yapılır. Her ne kadar doğrudan Gram boyama ile hem Gram reaksiyon hem de morfoloji belirlenebilirse de morfolojik inceleme için basit boyama önerilmektedir.

Mikroskopta incelenecek materyal agarlı besiyeri üzerinde ise 1 mL kadar fizyolojik tuzlu su içeren küçük deney tüpüne aktarılır, tercihen tüp karıştırıcıda kuvvetlice karıştırılıp homojen süspansiyon haline getirilir. Sıvı besiyerindeki kültür doğrudan kullanılır. Bu kültürlerden temiz bir lam üzerine 1–2 öze dolusu örnek, lam üzerine aktarılır ve lamın üzerine ince bir film tabakası halinde yayılır. Kendi halinde (havada) iyice kurummasının ardından lam üzerine fiksasyon (lam üzerine yapıştırma, tespit etme) işlemi yapılır. Fiksasyon, hücrelerin suyunu alarak lama yapıştırma ve boyama sırasında lam üzerinde yapışık kalmalarını sağlama işlemidir. Termal ve kimyasal olarak iki şekilde yapılır. Basit boyama işleminde termal fiksasyon uygulanır. Termal fiksasyon amacıyla lamın alt yüzü 2–3 kez Bunzen beki alevinden geçirilir.

Hazırlanan preparat üzerine Pastör pipeti ile ve genellikle Löffler's Methylene Blue çözeltisi ile preparat alanını kaplayacak şekilde damlatılır, 60 saniye beklenir ve damıtık su ile yavaşça yıkanır. Lam kendi halinde kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra yayma alanı üzerine 1 damla sedir (immersiyon) yağı damlatılarak 100X büyütme güçlü (immersiyon) objektifte incelenir.

38.02. Gram Boyama

Christian Gram tarafından 1884 yılında geliştirilmiş diferansiyel bir boyama tekniğidir. Sadece bakteriler için uygulanır. Bakteriler hücre çeperlerindeki lipit ve lipit türevlerine göre boyama sonunda mavi–mor (Gram pozitif) ya da kırmızı–pembe boyanırlar (Gram negatif). Bazı Gram pozitif bakteriler boyama sırasında kullanılan dekolorizatör (renksizlendirici) çözeltisine duyarlı oldukları için bunlar da kırmızı–pembe renkte görülebilir, bunlar Gram labil (duyarlı) olarak adlandırılır. Bazı bakterilerin ise çok yaşlı kültürleri farklı reaksiyon verir. Bunlar da Gram variable (değişken) olarak adlandırılır. Gram variable etkiden sakınmak için bakterilerin 18–24 saatlik kültürleri kullanılır.

Preparat yukarıda basit boyama kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanır. Fiksasyondan sonra Crystal Violet çözeltisi damlatılıp 1 dakika beklenir, boyanın fazlası uzaklaştırılır. Sonra Lugol iyot çözeltisi ile yıkanır, tekrar aynı iyot çözeltisi damlatılıp 1 dakika beklenir. Preparat saf su ile yıkandıktan sonra lam üzerine dekolorizatör çözeltisi ilave edilip, 25–30 saniye süre ile lam hareket ettirilerek beklenir ve saf su ile yıkanır. Son olarak Safranin çözeltisi ile kaplanır, 30 saniye beklenir, saf su ile yıkanır. Lam kendi halinde kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra yayma alanı üzerine 1 damla sedir (immersiyon) yağı damlatılarak 100X büyütme güçlü (immersiyon) objektifte incelenir.

Gram boyamada özellikle dekolorizatör olarak kullanılan çözeltinin bileşimi, boyaların konsantrasyonu gibi faktörlere göre değişmek üzere farklı uygulama süreleri olduğu göz önünde tutulmalıdır.

Gram boyama için hazır ticari boyama kitleri vardır (Merck 1.11885)

38.03. Hareket Testi (Asılı Damla)

Normal bir lamel üzerine 1–2 öze dolusu bakteri kültürü damla olacak şekilde aktarılır. Çukur lamın çukur kısmının kenarlarına vazelin sürülür ve lamın çukur kısmı damla üzerine gelecek şekilde yerleştirilir. Vazelin lam ile lamelin yapışmasını sağlar. Lam dikkatli bir şekilde ters çevrilir, bu pozisyonda damla lamele asılı halde kalır. Damla lamelde asılı kalmalı, lama düşmemelidir. Kültür fazla aktarılırsa damlanın düşme olasılığı da artar. Lamel üzerine 1 damla sedir (immersiyon) yağı damlatılarak 100X büyütme güçlü (immersiyon) objektifte mikroskop diyaframı kısık bir şekilde incelenir. Aşırı aydınlık bir mikroskopta hem bakteriler görülemez hem de bakteriler giderek hareketsizleşir.

39. Seyreltme Çözeltileri

39.01. Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)	255
39.02. Ringer Çözeltisi; ¼ Kuvvetinde (Merck 1.15525)	255
39.03. %20 Glikoz Çözeltisi	255
39.04. %35 Glikoz Çözeltisi	256
39.05. %50 Glikoz Çözeltisi	256
39.06. %0,1 Peptonlu Su	256
39.07. %2 Sodyum Sitrat Çözeltisi	256
39.08. Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi	257

39.01. Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

Bileşimi, Peptone 1,0 g/L; NaCl 8,5 g/L şeklindedir. ISO 6887'ye uygun genel amaçlı bir seyreltme çözeltisidir. Bu standarda göre 9,5 g/L hesabı ile hazırlanır. Kaplara amaca göre 225 mL, 90 mL, 9 mL olacak şekilde dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Otoklav sonrasında laboratuvar sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Standart gıda analizinde 1 adet 90 mL, 2 adet 9 mL olmak üzere 1 analiz için gereken çözelti 108 mL'dir. Bu miktar için 1,026 g dehidre halde Maximum Recovery Diluent kullanılır. 500 g olan 1 kutu dehidre Maximum Recovery Diluent ile 487 gıda analizi yapılabilir.

39.02. Ringer Çözeltisi; ¼ Kuvvetinde (Merck 1.15525)

Bileşimi, NaCl 2,25 g/L; KCl 0,105 g/L; susuz CaCl₂ 0,06 g/L; NaHCO₃ 0,05 g/L şeklindedir. Burada verilen bileşim doğrudan ¼ kuvvetinde olan standart kullanım içindir ve Ringer çözeltisi her zaman ¼ kuvvetinde olarak anılır. ISO 6887 ve IDF (Uluslararası Sütçülük Federasyonu)'ye uygun bir seyreltme çözeltisidir. Genel olarak süt ve ürünleri için kullanılmakla beraber, özellikle ozmotik basınç değişikliği nedeni ile hasar görmüş ve/veya hassas bakteriler için de önerilmektedir. ¼ Ringer çözeltisi hazırlamak için 1 tablet 500 mL damıtık suya ilave edilip karıştırılır, erlen ve/veya tüplere uygun hacimlerde dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 6,9 ±0,1'dir. Standart gıda analizinde 1 adet 90 mL, 2 adet 9 mL olmak üzere 1 analiz için gereken çözelti 108 mL'dir. 100 adet tablet olan 1 kutu ile 462 analiz yapılır.

39.03. %20 Glikoz Çözeltisi

Hazır ticari besiyeri değildir. Ozmofilik–ozmotolerant mayaların analizinde kullanılan bu çözeltinin hazırlanması için önce erlene 100 mL su konulur, su

seviyesi işaretlenir, su boşaltılıp 20 g glikoz (dextrose monohidrat; Merck 1.08342) tartılır, üzerine işaretli yere kadar damıtık su konulur ve karıştırılır. Glikozun monohidrat formda olması önemli değildir.

39.04. %35 Glikoz Çözeltisi

Ozmofilik/ozmotolerant mayaların analizinde kullanılan bu çözeltinin hazırlanması için önce erlene 100 mL su konulur, su seviyesi işaretlenir, su boşaltılıp 35 g glikoz (dextrose monohidrat; Merck 1.08342) tartılır, üzerine işaretli yere kadar damıtık su konulur ve karıştırılır. Glikozun monohidrat formda olması önemli değildir.

39.05. %50 Glikoz Çözeltisi

Ozmofilik/ozmotolerant mayaların analizinde kullanılan bu çözeltinin hazırlanması için önce erlene 100 mL su konulur, su seviyesi işaretlenir, su boşaltılıp 50 g glikoz (dextrose monohidrat; Merck 1.08342) tartılır, üzerine işaretli yere kadar damıtık su konulur ve karıştırılır. Glikozun monohidrat formda olması önemli değildir.

39.06. %0,1 Peptonlu Su

ISO 6887'ye uygun genel amaçlı bir seyreltme çözeltisidir. Peptone from Meat Pancreatic (Merck 1.07214) %0,1 konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde eritilir ve amaca uygun olarak tüplere ve/veya erlenlere dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. 1 kg olan 1 kutu pepton ile 1000 litre Peptonlu Su çözeltisi hazırlanır. Seyreltme amacı ile kullanılacak ise ve standart gıda analizinde 1 adet 90 mL, 2 adet 9 mL olmak üzere 1 analiz için gereken çözelti 108 mL olduğuna göre 1 kutu pepton 9259 analiz için yeterlidir.

39.07. %2 Sodyum Sitrat Çözeltisi

ISO 6887'ye uygun bir seyreltme çözeltisidir. Özellikle peynirlerin homojenize edilmesi amacı ile kullanılır. Bu amaçla 20 g/L konsantrasyonda olacak şekilde tri Sodyum Sitrat (Merck 1.06448) damıtık su içinde 45–50 °C'da ısıtılarak eritilir, Otoklav sonrasında 25 °C'da pH'sı 7,5±0,2 olacak şekilde ayarlanır, amaca uygun erlen ve/veya tüplere dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir.

39.08. Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi

Anaerobların homojenizasyonu ya da seyreltmeleri için ortamdaki oksijeni bağlayan çözeltiler kullanılmalıdır. Bu amaçla Pepton from Casein (Merck 1.07213) %0,1; Cystein chloride monohydrate (Merck 1.02839) %0,05; NaCl (Merck 1.06404) %0,85 olacak şekilde bileşenler damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilir ve uygun kaplara (erlen ve/veya tüpler) dağıtılarak otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir.

40. Genel Kullanım

40.01. CASO (Tryptic Soy) Broth (Merck 1.05459)	257
40.02. CASO (Tryptic Soy) Agar (Merck 1.05458)	257
40.03. Brain Heart Broth (Merck 1.10493)	258
40.04. Brain Heart Agar (Merck 1.13825)	258
40.05. Phenol Red Broth Base (Merck 1.10987)	258
40.06. Kanlı Agar (Merck 1.10886)	259
40.07. Skim Milk Powder (Yağsız süt tozu)	259
40.08. Sterikon; Biyolojik Sterilizasyon İndikatörü (Merck 1.10274)	260
40.09. Alkali Pepton (Tuz; Salt) Besiyeri (Merck 1.01800)	260
40.10. Su Agar	260
40.11. Tryptone (İndol) Besiyeri (Merck 1.10859)	261

40.01. CASO (Tryptic Soy) Broth (Merck 1.05459)

Çok amaçlı genel besiyeridir. Bileşimi, Peptone from Casein 17,0 g/L; Peptone from Soymeal 3,0 g/L; D(+) Glucose 2,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; K₂HPO₄ 2,5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 30,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilir. Amaca uygun şekilde tüplere ve/veya erlenlere dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renktedir ve buzdolabında 2 ay depolanabilir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 16,6 litre besiyeri hazırlanır.

40.02. CASO (Tryptic Soy) Agar (Merck 1.05458)

Çok amaçlı genel besiyeridir. Bileşimi, Peptone from Casein 15,0 g/L; Peptone from Soymeal 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; agar 15,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 40,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir. Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilip steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış

besiyeri berrak sarımsı renktedir ve buzdolabında 2 ay depolanabilir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı $7,3 \pm 0,2$ 'dir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1000 Petri kutusu hazırlanabilir.

40.03. Brain Heart Broth (Merck 1.10493)

Bileşimi, Nutrient Substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 g/L; D(+) Glucose 2,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Na_2HPO_4 2,5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 37 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilip tüplere 10'ar mL dağıtılır ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı $7,4 \pm 0,2$ 'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahverengidir. Buzdolabında 2 ay depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1351 adet tüp hazırlanabilir.

40.04. Brain Heart Agar (Merck 1.13825)

Bileşimi, Nutrient Substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 g/L; D(+) Glucose 2,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Na_2HPO_4 2,5 g/L; agar 15,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 52 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir ve steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı $7,4 \pm 0,2$ 'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve bazen hafif opalesent (meneviş, yanar döner) ve kahverengidir. Buzdolabında 2 ay depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 769 Petri kutusu hazırlanabilir. Brain Heart Infusion (Merck 1.10493) besiyerine 15 g/L olacak şekilde agar (Merck 1.01613) ilavesi ile de Brain Heart Agar besiyeri hazırlanabilir.

40.05. Phenol Red Broth Base (Merck 1.10987)

Bileşimi, Peptone from Casein 5,0 g/L; Peptone from Meat 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Phenol red 0,018 g/L şeklindedir. Bakteri tanımlaması çalışmalarında kullanılan bu besiyerinin hazırlanması standart besiyeri hazırlamasından farklıdır. Dehidre besiyeri 1,5 g/80 mL olarak damıtık su içinde eritilir, tüplere 4'er mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Denenecek şeker 0,5 g/ 10 mL olarak hazırlanıp, filtre ile sterilize edilir ve tüplerdeki besiyeri üzerine 1 mL eklenir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve Phenol red indikatörüne bağlı olarak kırmızı renktedir, 25 °C'da pH'sı $7,4 \pm 0,2$ 'dir. Oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Tüplere bakteri ilavesinden sonra uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda rengin sarıya dönüşmesi bakterinin denenen şekerden asit

oluşturduğunu (şekeri fermente ettiğini) gösterir. Burada verilen şeker konsantrasyonu %1'dir ve bu konsantrasyon literatürde yaygın olarak %0,5–1 olarak belirtilmektedir. Bununla birlikte, şeker konsantrasyonunun %1'den az olması halinde sahte negatif sonuçlar alınabilmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 33,3 L besiyeri (şeker ilavesinden sonra 5 mL olan tüplerden 6666 adet) hazırlanabilir.

40.06. Kanlı Agar (Merck 1.10886)

Bazal besiyerinin bileşimi, Nutrient substrat (kalp ekstraktı ve peptonlar) 20,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; agar 15,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 40 g/L konsantrasyonda olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilip otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilip, otoklav çıkışında 50 °C'a soğutulur ve %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Bazal besiyeri berrak ve sarımsı kahve rengindedir ve 25 °C'da pH'sı $6,8 \pm 0,2$ 'dir. Kan ilave edilmiş besiyeri buzdolabında en çok 3 ay depolanabilir. Standart ekimden ve inkübasyondan sonra kanlı agar Petri kutuları hemoliz açısından değerlendirilir. *S. aureus* tipik β hemoliz oluşturur. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile %5 kan ilave edilmek üzere ve 12,5 mL/ Petri kutusu hesabı ile 1050 Petri kutusu elde edilir. Bu besiyerinin dış laboratuvarlardan sağlanması tavsiye edilir. At, sığır gibi hayvanların yerine koyun kanı kullanılmasının nedeni koyundan kan alınmasının çok kolay olmasıdır. İnsan kanı kullanılmamasının nedeni kan gruplarıdır. Adı geçen diğer hayvan kanlarında kan grubu farkı olmadığı için antijenik özellikleri yoktur. İnsan kanı kullanılması klinik mikrobiyolojide bazı sahte pozitif reaksiyonlara neden olabildiği için benimsenmemektedir. Kan bileşiminde bulunan fibrinler, kanı pıhtılaştıran faktörlerden birisidir. Besiyeri bünyesine katılacak kanın pıhtılaşmamış olması gerekir ve buna bağlı olarak kan defibrine edilir. Geçmiş dönemlerde kan, içinde cam boncuk olan tüplere alınıp, mekanik olarak fibrinlerin cam boncuk üzerinde toplanması ve dolayısı ile kanın pıhtılaşmaması sağlanırken, artık doğrudan antikoagülan içeren tüplere kan alınmaktadır.

40.07. Skim Milk Powder; Yağsız Süt Tozu

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan süt tozunun antibiyotik içermeyen sütlerden yapılmış ve yağı ayrılmış olması gerekir. Dehidre Skim Milk (yağsız süt tozu) %10 konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanabildiği gibi, çeşitli besiyerlerine de ilave edilebilir. Standart hazırlama şeklinde 10 g dehidre besiyeri 100 mL damıtık suda tam olarak eritilir, uygun kaplara dağıtılıp, otoklavda 115 °C'da 10 dakika sterilize edilir.

40.08. Sterikon; Biyolojik Sterilizasyon İndikatörü (Merck 1.10274)

Geobacillus stearothermophilus (Syn. *Bacillus stearothermophilus*) sporları ısıtılma işlemine çok dirençlidir. Otoklavlama işlemi sırasında bu bakteri sporunun tümüyle yok edilmiş olması aynı otoklavlama sürecinde otoklavlanan tüm malzemenin sterilize edildiğini gösterir. Sterikon, bu amaçla hazırlanmış ve içinde canlı sporlar, bu bakteri için besiyeri ve pH indikatörü bulunan 2 mL hacimli bir ampuldür. Başlangıçta menekşe rengi olan spor çözeltisi otoklavlandıktan sonra 60 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda rengin değişmemiş olması sporların tümüyle ölmüş olduğunu gösterir. Otoklavlama sırasında tek 1 spor dahi canlı kalmış ise inkübasyon sırasında çimlenerek çoğalır, besiyeri rengini menekşeden sarı-turuncuya çevirir (bakınız; Ek B 60). Spor süspansiyonun buzdolabında korunması gerekir. Oda sıcaklığında en çok 1-2 hafta kadar depolanması mümkündür. Sterikon, Form FDA 2400 (3/01)'e uygundur.

40.09. Alkali Pepton (Tuz; Salt) Besiyeri (Merck 1.01800)

Bu besiyeri "Alkali Pepton Tuz (Salt) besiyeri" olarak da bilinir. Bileşimi, Peptone 10,0 g/L ve NaCl 10,0 g/L şeklindedir. 20,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahverengidir, 25 °C'da pH'sı 8,5±0,2'dir. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 25 litre besiyeri hazırlanır. Farklı pepton ve tuz bileşimleri ile farklı pH'larda hazırlanmış besiyerleri de alkali pepton olarak anılır. Örneğin *Vibrio parahaemolyticus* aranmasında kullanılan besiyerinin bileşimi 20,0 g pepton, 30 g NaCl şeklindedir ve otoklavlama sonrası pH 25 °C'a 8,6'dır. Bu besiyerini hazırlamak için basit olarak 1 litre damıtık su içinde 20 g pepton (Merck 1.07214) ve 30 g sodyum klorür (Merck 1.06404) eritilir, otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir, oda sıcaklığına soğuduğunda steril 1 N NaOH (Merck 1.06462) ile pH ayarlanır. pH otoklav öncesinde de 8,5'e ayarlanabilir. Otoklav sonrası pH tekrar kontrol edilmelidir.

40.10. Su Agar

Damıtık su içinde %1,5 konsantrasyonda olacak şekilde agar (Merck 1.01613) kaynatılarak eritilir, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri değildir, tüplerin üzerine ya da agarlı besiyerleri üzerine ilave edilerek kısmi bir anaerob ortam sağlamak için kullanılır.

40.11. Tryptone (İndol) Besiyeri (Merck 1.10859)

İndol testinde kullanılan bu besiyerinin bileşimi, Peptone from Casein (triptofan) 10,0 g/L ve NaCl 5 g/L şeklindedir. 15,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde çözülür, tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsıdır, 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir. İnkübasyondan sonra 2 mL kadar Kovacs' indol çözeltisi ilave edilir, 10 saniye içinde tüpün üstünde vişne çürüğü renkli bir halka oluşumu indol pozitif olarak değerlendirilir. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 10 mL olacak şekilde 3333 adet tüp hazırlanabilir. *Vibrio* analizinde kullanılacağı zaman besiyerine 25 g/L NaCl ilave edilerek hazırlanır.

41. Toplam Bakteri Analiz Malzemesi

41.01. Plate Count Agar (Merck 1.05463)	261
41.02. Plate Count Skim Milk Agar (Merck 1.15338)	261

41.01. Plate Count Agar (Merck 1.05463)

Bileşimi, Peptone from Casein 5,0 g/L; Yeast extract 2,5 g/L; D(+) Glucose 1,0 g/L; Agar 14,0 g/L şeklindedir. Genel besiyeridir. Casein-peptone Dextrose Yeast Agar adı ile de bilinir. Gıda endüstrisinde toplam bakteri sayımı için yaygın olarak kullanılır. Dehidre besiyeri 22,5 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir. Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilip, steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak, çok açık sarımsı renktedir ve 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Buzdolabında 2 ay depolanabilir. 500 g besiyeri kutusu ile 1777 Petri kutusu hazırlanabilir.

41.02. Plate Count Skim Milk Agar (Merck 1.15338)

Bileşimi, Peptone from Casein 5,0 g/L; Yeast extract 2,5 g/L; inhibitör içermeyen yağsız süt tozu [Skim Milk Powder (no inhibitors)] 1,0; Glucose 1,0 g/L; Agar 10,5 g/L şeklindedir. Yaygın kullanım alanı süt ürünlerinde toplam bakteri sayımı içindir. Dehidre besiyeri 20 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir. Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilip steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri opalesent (meneviş, yanar döner) sarımsı renktedir ve 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Buzdolabında 2 ay depolanabilir. 500 g besiyeri kutusu ile 2000 Petri kutusu hazırlanabilir.

42. Koliform Grup Bakteriler Analiz Malzemesi

42.01. VRB (VRBL) Agar (Merck 1.01406)	262
42.02. LST Broth (Merck 1.10266)	263
42.03. Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454)	263
42.04. ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298)	264
42.05. Lactose TTC Agar with Tergitol 7 (Merck 1.07680)	264
42.06. Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)	265
42.07. Chromocult Coliform Agar (Enhanced Selectivity) ES (Merck 1.00850)	265
42.08. Envirocheck Contact C (Merck 1.02136)	266

42.01. VRB (VRBL) Agar (Merck 1.01406)

Bileşimi, Peptone from meat 7,0 g/L; Yeast Extract 3,0 g/L; Lactose 10,0 g/L; NaCl 5 g/L; Ox Bile (Bile Salt Mixture) 1,5 g/L; Neutral Red 0,03 g/L; Crystal Violet 0,002 g/L; Agar 13 g/L şeklindedir. ISO 4832 ve FDA Form 2400a 3/01 ve daha pek çok uluslararası standarda uygun olarak koliform grup analizinde kullanılır. VRBL (Violet Red Bile Lactose) adı ile de anılır. Dehidre besiyeri 39,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde karıştırılarak kaynatılır ve kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, soğuyunca steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,4±0,2'dir. VRB Agar besiyerinin aşırı ısıtılmasından kaçınılmalıdır. Aşırı ısıtma selektiviteyi azaltır. Kaynar su banyosundaki ısı işlem etkinliğinin sağlanması için besiyerinin 250 mL'den fazla hacimlerde hazırlanmaması önerilir. Önceden 0,5 litre erlen içine 250 mL damıtık su konulup ağzı kapatılarak otoklavda sterilize edilmesi ve besiyerinin bu erlende hazırlanıp eritilmesi önerilir. Hazırlanmış besiyeri parlak ve kırmızı-kahve renklidir. Besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole başta Gram pozitifler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini inhibe ederken laktoz pozitif bakterilerin varlığı pH indikatörü ile koloni renginin kırmızıya dönüşmesi ve safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile belirlenir. Dolayısıyla 30-32 ya da 35-37 °C'da 18-24 saat süren inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler Enterobacteriaceae familyasının laktoz pozitif üyeleri olan koliform grup bakteriler olarak sayılır (bakınız; Ek B 01). Enterokoklar ve koliform grup dışındaki *Klebsiella* türleri bu besiyerinde toplu iğne başı büyüklüğünde küçük pembe koloniler oluştururlarken, laktoz negatif olan Enterobacteriaceae üyeleri renksiz koloniler meydana getirirler. Laktozdan başka şeker içeren ve özellikle sıvı gıdaların doğrudan ekiminde Enterobacteriaceae familyasının koliform grup dışında kalanları başta olmak üzere bazı bakteriler atipik koloniler oluşturabilir. Atipik koloniler Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454) besiyerine aşılansak gaz oluşumu izlenmelidir. 500 g olan 1 kutu

dehidre VRB Agar besiyeri ile 12,5 mL/Petri olacak şekilde 1012 adet Petri kutusu hazırlanabilir.

42.02. LST Broth (Merck 1.10266)

ISO 4831 ve pek çok uluslararası standartta koliform grup bakterilerin EMS yolu ile sayılması için önerilen besiyeridir. Lauryl Sulfate Broth, Lauryl Sulfate Tryptose adları ile de bilinir. Bileşimi, Tryptose 20,0 g/L; Lactose 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sodium Lauryl Sulfate 0,1 g/L; K₂HPO₄ 2,75 g/L; KH₂PO₄ 2,75 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri tek kuvvet için 35,6 g/Litre; çift kuvvet için 71,0 g/Litre olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH 6,8±0,2'dir. Buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan lauryl sulfate refakatçi floranın gelişimini baskımlarken yüksek düzeyde bulunan besin maddeleri ve fosfat tampon "laktozu yavaş kullanan" koliform bakterilerin dahi hızlı gelişimini ve fazla miktarda gaz çıkışını sağlar. İnkübasyon sonunda gelişme saptanan tüplerde gaz çıkışı Durham tüplerinde gaz birikmesi ile belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyerinden tek kuvvette 1408 tüp hazırlanır.

42.03. Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454)

Bileşimi, Peptone 10,0 g/L; Lactose 10,0 g/L; Ox Bile 20,0 g/L; Brilliant Green 0,0133 g/L şeklindedir. Pek çok uluslararası standartta koliform doğrulama besiyeri olarak kullanıldığı gibi, bazı standartlarda koliform bakterilerin var/yok testinde zenginleştirme besiyeri olarak da kullanılmaktadır. Bu besiyeri Brilliant Green Bile Lactose Broth, Brilliant Green Bile Lactose Broth %2 ve BRILA Broth isimleri ile de bilinir. Dehidre besiyeri 40,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renktedir. Buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan brilliant green ve safra tuzları refakatçi floranın gelişimini baskımlarken, koliform grup bakteriler laktozdan gaz oluşturarak gelişirler (bakınız; Ek B 02). Laktozdan gaz oluşumu Durham tüpünde biriken gaz ile belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1250 tüp hazırlanır.

42.04. ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298)

Bileşimi, Fluorocult LMX Broth ile aynıdır. Bir diğer deyiş ile Fluorocult LMX Broth besiyeri analiz edilecek 100 mL suya doğrudan ilave edilecek şekilde hazırlanmış ve ışınlanarak sterilize edilmiştir. Analiz edilecek suya ilave edilip karıştırılır ve doğrudan inkübasyona bırakılır. Besiyeri bileşimindeki lauryl sulfate refakatçi florayı inhibe ederken, kromojenik substrat X-GAL koliform bakterilerin, MUG ise *E. coli* 'nin belirlenmesinde kullanılır. Buna göre 35–37 °C'da 18–24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyerinin mavi–yeşil olması koliform bakterilerin varlığını gösterir (bakınız; Ek B 13). Besiyerinin sadece üst kısmında bu renk değişimi olur ise aynı şekilde koliform grup bakteri pozitif olarak değerlendirilir. Koliform grup pozitif bulunan örnekler daha sonra UV lambası ile (Merck 1.13203) floresan testi yapılır. Floresan ışımaya *E. coli* varlığını gösterir. Su analizinde koliform ve *E. coli* varlığını/yokluğunu gösteren test için kullanır. Bu nedenle analizin yapılacağı kabın önceden sterilize edilmiş olması gereklidir. Aynı şekilde besiyeri su örneğine ilave edilirken gerekli hijyenik kurallara uyulmalıdır. Bu besiyeri 20 analizlik paketler halinde. ReadyCult Coliforms besiyerinin 50 mL su analizi için olan şekli de vardır (Merck 1.01295).

42.05. Lactose TTC Agar with Tergitol 7 (Merck 1.07680)

Bileşimi, Lactose 20,0 g/L; Peptone 10,0 g/L; Yeast extract 6,0 g/L; Meat extract 5,0 g/L; Bromothymol Blue 0,05 g/L; Tergitol 7 0,1 g/L; agar 12,7 g/L şeklindedir. ISO 9308-1 sayılı standarda uygun olarak özellikle su analizlerinde koliform bakterilerin membran filtrasyon yöntemi ile sayılmasında kullanılır. 53,9 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. 45–50 °C'a soğutulup, 0,025 g/L konsantrasyonda olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş 2,3,5 Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC; Merck 1.08380) ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına en az 5 mm kalınlık olacak şekilde dökülür. TTC ilavesinde pratik olarak 100 mL bazal besiyerine %0,05 konsantrasyondaki çözeltiden 5 mL ilave edilmektedir. TTC çözeltisi ve dolayısı ile TTC ilave edilmiş ve Petri kutularına dökülmüş besiyeri buzdolabında ve karanlıkta saklanmak koşulu ile en çok 1 hafta depolanabilir. Otoklavlanmış besiyerinin 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renktedir. 35–37 °C'da 18–24 saat inkübasyondan sonra sarı renkli koloniler koliform bakterileri (laktoz pozitif), kırmızı koloniler *Pseudomonas* gibi laktoz negatif kolonileri gösterir (bakınız; Ek B 06). Besiyeri genellikle standart membran filtrenin yerleştirileceği gibi 60 mm steril tek kullanımlık plastik Petri kutularında hazırlanır. Bu Petri kutularında 5 mm yükseklik olacağına göre 15 mL/Petri hesabı ile 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 618 adet Petri hazırlanır.

42.06. Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)

Bileşimi, Peptone 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; NaH₂PO₄ 2,2 g/L; Na₂HPO₄ 2,7 g/L; Sodium pyruvate 1,0 g/L; Tryptophane 1,0 g/L; Agar 10,0 g/L; Sorbitol 1,0 g/L; Tergitol 7 0,15 g/L; Chromogenic mixture 0,4 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 26,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde yaklaşık yarım saat süre ile karıştırılarak kaynatılır ve soğuyunca steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Besiyerinde oluşabilecek bulanıklık besiyeri performansını etkilemez. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri opalesent (meneviş, yanar döner) ve sarımsı renktedir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 6,8 ±0,1'dir. Buzdolabında, ışık almayacak şekilde ve kurumayı önlemek üzere stretch film ile sarılarak 6 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan seçilmiş peptonlar, piruvat ve fosfat tampon ağır hasar görmüş koliform bakterilerin kendilerini onarmalarını sağlarken tergitol-7, Gram pozitiflerin ve bazı Gram negatiflerin gelişimini baskılar. Koliform grup bakteriler için karakteristik olan β-D-galactosidase enzimi Salmon-GAL kromojenik substratını parçalayarak koliform bakterilerin pembemsi kırmızı koloni oluşturmalarını sağlar. Bileşimdeki X-Glucuronide substratı ise *E. coli* için karakteristik olan β-D-Glucuronidase enzimi tarafından parçalanır. Böylece *E. coli* koliform bakteri olarak Salmon-GAL'i parçalaması yanında X-Glucuronide substratını da parçalayarak diğer koliform bakterilerden koyu mavi-menekşe renkli koloni oluşturmaları ile ayrılır (bakınız; Ek B 03). Besiyeri bileşimindeki triptofan varlığı doğrudan koloni üzerinde indol testi yapılmasına izin verir. Chromocult Coliform Agar besiyerinde diğer Gram negatifler renksiz koloni oluştururlar. Bunlardan bir kısmı β-D-Glucuronidase aktivitesi nedeni ile açık mavi-turkuaz renkli koloniler meydana getirirler. Gıda analizlerinde özellikle *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türleri başta olmak üzere yoğun bir refakatçi flora kontaminasyonu var ise kaynatarak yapılan sterilizasyon sonrasında besiyeri 45–50 °C'a soğutulup cefsulodin ilavesinin besiyerinin selektivitesini artıracak literatürde belirtilmektedir. İlave edilecek cefsulodin miktarı 1 litre besiyeri için yayma ve dökme yöntemleri ile ekim yapıldığında 5 mg; membran filtre ekimlerinde 10 mg olmalıdır. 5 mg Cefsulodin, 1 mL damıtık su içinde çözülerek besiyerine ilave edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1509 adet Petri kutusu hazırlanabilir.

42.07. Chromocult Coliform Agar (Enhanced Selectivity) ES (Merck 1.00850)

Koliform grup bakteriler ve *E. coli* 'nin beraberce belirlenmesi için geliştirilmiş ve selektivitesi artırılmış bir besiyeridir. Bileşimi, Peptone 5,0 g/L; KCl 7,5 g/L; MOPS 10,0 g/L; Bile salts 1,15 g/L; Propiyonat 0,5 g/L; 6-chloro-3-indoxyl-beta-

D-galactopyranoside 0,15 g/L; isopropyl-beta-D-thio-galactopyranoside 0,1 g/L; 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronic acid 0,1 g/L; Agar 10,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 34,5 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde kaynatılarak ve sürekli karıştırılarak eritilir. 45–50 °C'a soğutulup Petri kutularına dökülür. Bu sıcaklıkta 2 saatten fazla beklenirse presipitat görülebilir. Bu besiyeri otoklavlanmaz ve aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve renksizdir. 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Buzdolabı sıcaklığında 2 haftaya kadar depolanabilir. Peptonların ve MOPS'un uygun kombinasyonu koliformların hızlı gelişmesini ve kromojenik bileşenlerin optimum transformasyonunu sağlar. Safra tuzları ve propiyonat Gram pozitif ve Gram negatif refakatçi florayı baskılar. Koliform grup ve *E. coli* 'nin beraberce belirlenmesi iki kromojenik substrat ile sağlanır. Salmon-beta-D-GAL koliformlar için karakteristik olan beta-D-galactosidase ile parçalanır ve koliform kolonilerinin somon–kırmızı renkte olmasını sağlar. *E. coli* için karakteristik olan beta-D-glucuronidaz enzimi ise X-beta-D-glucuronide substratını parçalayarak koloninin mavi–menekşe renk almasını sağlar (bakınız; Ek B 04). *E. coli* O157 serotipleri gibi beta-D-glucuronidaz enzimi olmayan bakteriler somon–kırmızı renkli koloniler oluşturur. Yüksek asitli gıdalarda asitlik ile koloni rengi arasında etkileşim olmaması için tamponlanmış peptonlu su ile hazırlanmış 1/10 seyreltisinin kullanılması önerilmektedir. Membran filtre tekniği ile de kullanılabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL olacak şekilde 1159 adet Petri kutusu hazırlanabilir.

42.08. Envirocheck Contact C (Merck 1.02136)

Plastik ve eğilebilir özellikte olan bir tabakanın bir yüzünde Plate Count Agar, diğer yüzünde Chromocult Coliform Agar besiyeri vardır. Agar yüzeyleri hafif bombeli olduğu için sayım yapılacak yüzeye temas ettirildiğinde yüzeydeki mikroorganizmalar kolaylıkla besiyerine geçer. 35–37 °C'da 24 (gerekirse 48) saat yapılacak inkübasyondan sonra oluşan koloniler sayılır ve kob/cm² olarak verilir (bakınız; Ek B 07). Amaca göre inkübasyon sıcaklığı olarak 30–32 °C da seçilebilir. Akan ya da durağan nitelikteki sulara önceden belirlenmiş bir süre daldırılarak inkübasyon sonunda bu sulara koliform grup bakteri ve toplam bakteri sayısı hakkında temiz, az kirli, çok kirli şeklinde göreceli bir sonuç elde edilebilir.

43. Fekal Koliform Bakteri Analiz Malzemesi

43.01. LST Broth (Merck 1.10266)	267
43.02. EC Broth (Merck 1.10765)	267
43.03. A-1 Broth (Merck 1.00415)	267
43.04. VRB (VRBL) Agar (Merck 1.01406)	268

43.01. LST Broth (Merck 1.10266)

Bakınız; 42.02. Bölüm.

43.02. EC Broth (Merck 1.10765)

Bileşimi, Peptone from Casein 20,0 g/L; Lactose 5,0 g/L; Ox Bile Mixture (Safr tuzları karışımı) 1,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; K₂HPO₄ 4,0 g/L; KH₂PO₄ 1,5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 37 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan deney tüplerine 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH 6,9±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı-kahve renktedir. 44,5–45,5 °C'da 24 (gerekirse 48) saat süre ile inkübe edilir. Bu sürenin sonunda gelişme ve Durham tüplerinde gaz görülen tüpler pozitif olarak işaretlenir ve standart EMS çizelgesinden örnekteki fekal koliform sayısı hesaplanır. 500 g dehidre besiyeri ile 1351 adet 10 mL tüp hazırlanabilir.

43.03. A-1 Broth (Merck 1.00415)

Bileşimi, Peptone from Casein 20,0 g/L; Lactose 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Salicin 0,5 g/L ve Triton X 100 1,0 mL/L şeklindedir. Bu besiyeri ABD- Çevre Koruma Ajansı (US- EPA) standart su analiz yöntemlerine uygundur. Dehidre besiyeri tek kuvvette 31,5 g/L ve çift kuvvette 63,0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, içlerinde ters çevrilmiş Durham tüpü bulunan uygun büyüklükteki tüplere 10'ar mL dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 10 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 6,9±0,2'dir. Standart analizde 3 adet çift kuvvetli besiyeri büyük (18 mm çaplı) tüplere ve tek kuvvetli 6 adet besiyeri standart (16 mm çaplı) tüplere dağıtılır. Analizde su örneğinden 3 adet çift kuvvetli besiyerine 10'ar mL, 3 adet standart tek kuvvette besiyerine 1'er mL ve 3 adet standart tek kuvvette besiyerine 0,1'er mL su örneği eklenir. Buna göre 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 132 su analizi yapılabilir. Besiyeri bileşimindeki laktoz, kazein ve salisin besin maddesi iken, NaCl ozmotik dengeyi sağlar, Triton X 100 ise

deterjan olarak görev yapar. Hazırlanmış besiyeri berrak, hafifçe menevişli ve sarımsı renktedir. Karanlıkta ve soğukta olmak kaydı ile 3 aya kadar depolanabilir.

43.04. VRB (VRBL) Agar (Merck 1.01406)

Bakınız; 42.01. Bölüm.

44. *E. coli* Analiz Malzemesi

44.01. VRB (VRBL) Agar (Merck 1.01406)	268
44.02. Fluorocult VRB Agar (Merck 1.04030)	268
44.03. Bactident <i>E. coli</i> (Merck 1.13303)	269
44.04. UV El Lambası (Merck 1.13203)	269
44.05. Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)	269
44.06. Chromocult Coliform Agar (Enhanced Selectivity) ES (Merck 1.00850)	269
44.07. Chromocult TBX Agar (Merck 1.16122)	270
44.08. LST Broth (Merck 1.10266)	270
44.09. EC Broth (Merck 1.10765)	270
44.10. Tryptone Water (Merck 1.10859)	270
44.11. Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293)	271
44.12. Fluorocult LST Broth (Merck 1.12588)	271
44.13. ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298)	271
44.14. Fluorocult LMX Broth (Merck 1.10620)	271
44.15. Envirocheck Contact C (Merck 1.02136)	272
44.16. Fluorocult Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.12587)	272

44.01. VRB (VRBL) Agar (Merck 1.01406)

Bakınız; 42.01. Bölüm.

44.02. Fluorocult VRB Agar (Merck 1.04030)

Bileşimi, Peptone 7,0 g/L; Yeast Extract 3,0 g/L; Lactose 10,0 g/L; NaCl 5 g/L; Ox Bile (Bile Salt Mixture) 1,5 g/L; Neutral Red 0,03 g/L; Crystal Violet 0,002 g/L; Agar 13 g/L; MUG 0,1 g/L şeklindedir. VRB Agar+MUG besiyeri "Fluorocult VRB Agar" ticari adı ile de anılmaktadır. Standart VRB Agar besiyerinden farkı hazırlanmasının 39,6 g/L şeklinde yapılması ve inkübasyon sonrasında koliform grup bakteriler arasından uzun dalga boylu UV el lambası ile (Merck 1.13203) *E. coli* 'nin ayrılmasıdır (bakınız; Ek B 09). Kolonilerin floresan ışımayı dağıtması

nedeni ile gerçekte olduğundan daha fazla *E. coli* sayılmasından sakınmak için inkübasyon 18 saati geçmemelidir. Var/yok esaslı testlerde inkübasyon süresi 24 saat olabilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı–kahve renklidir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1010 adet Petri kutusu hazırlanabilir.

44.03. Bactident *E. coli* (Merck 1.13303)

MUG reaksiyonundan yararlanılarak bir katı besiyerinden elde edilen izolatın 30–120 dakika içinde *E. coli* olup olmadığının belirlenmesi için geliştirilmiş bir test kitidir. Koloninin izole edildiği besiyerinin karbohidrat içeriği ne kadar az ise sonuç o denli hızlı alınır. Sistemin uygulanması koloninin 0,2 mL damıtık su içinde yoğun bir bulanıklık verecek şekilde çözülmesi, test şeridini bu süspansiyona daldırarak ve her 30 dakikada kontrol ederek en çok 2 saat süre ile 37 °C'da inkübe edilmesi, uzun dalga boylu UV el lambası (Merck 1.13203) ile yapılan kontrollerde floresan ışınım görülürse koloninin *E. coli* olduğuna karar verilmesi şeklindedir. Floresan pozitif sonuçlar için inkübasyonun yapıldığı küvete 1 damla Kovacs' indol çözeltisi damlatılarak floresan pozitif bakterinin *E. coli* olup olmadığı kesinleştirilir. Test kiti 50 test şeridi, 50 reaksiyon küveti, bu küvetler için özel tüp spor ve 50 test için yetecek şekilde Kovacs' indol çözeltisi olan şişe olarak pazarlanmaktadır.

44.04. UV El Lambası (Merck 1.13203)

MUG reaksiyonunun belirlenmesi için kullanılan 4 W gücünde uzun dalga boyu (366 nm) UV ışını sağlayan el lambasıdır (bakınız; Ek B 08). Diğer amaçlar için kullanılan UV lambaları ve çeşitli cihazlar ile kombine halde bulunan farklı dalga boylarındaki UV lambaları MUG reaksiyonunun belirlenmesinde sıklıkla sahte negatif sonuçlar vermektedir.

44.05. Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)

Bakınız; 42.06. Bölüm.

44.06. Chromocult Coliform Agar (Enhanced Selectivity) ES (Merck 1.00850)

Bakınız; 42.07. Bölüm.

44.07. Chromocult TBX Agar (Merck 1.16122)

Bileşimi, Peptone 20,0 g/L; Bile salts (Safr tuzları) no 3 1,5 g/L; X-β-D-glucuronide 0,075 g/L; Agar 15,0 g/L şeklindedir. ISO 16649'a göre gıda ve yemlerde *E. coli* analizinde kullanılan dehidre besiyeri 36,6 g/L konsantrasyonda ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilip, Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Buzdolabında ve karanlıkta 1 hafta depolanabilir. Besiyeri bileşimindeki kromojen substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-β-D-glucuronide) *E. coli* 'deki β-D-glucuronidase enzimi ile bu substratı 5-bromo-4-chloro-3-indolyl ve β-D-glucuronide'e parçalar, sonuç olarak *E. coli* kolonileri mavi–yeşil renkli olarak görülür (bakınız; Ek B 10). Refakatçi flora safr tuzlarıyla baskılanır. İnkübasyonun 44 °C'da yapılması da refakatçi florayı baskılayan bir başka etkidir. İşlem görmüş gıdalarda *E. coli* analizi için önce 30–37 °C'da 4 saat canlandırma işleminden sonra inkübasyon sıcaklığının 44 °C'a çıkartılması ve 18–20 saat inkübasyon yapılması önerilmektedir. Bu besiyeri membran filtrasyon tekniğinde de başarıyla kullanılmaktadır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri kutusu hesabı ile 1092 Petri kutusu hazırlanabilir. ISO 16649 bu besiyerinin dökme kültür yöntemi ile kullanılmasını önermektedir.

44.08. LST Broth (Merck 1.10266)

Bakınız; 42.02. Bölüm.

44.09. EC Broth (Merck 1.10765)

Bakınız; 43.02. Bölüm.

44.10. Tryptone Water (Merck 1.10859)

Bileşimi, Pepton from Casein 10,0 g/L; NaCl 5,0 g/L şeklindedir. İndol besiyeri adı ile de bilinir. İndol testi için kullanılan dehidre besiyeri 15 g/L konsantrasyonda hazırlanır. Tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,3'tür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı olup oda sıcaklığında 2 aya kadar depolanabilir. İnokülasyondan sonra 35–37 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra 1 mL Kovacs' indol ayırıcı (Merck 1.09293) damlatılarak indol testi yapılır (bakınız; Ek B 11). *E. coli* indol pozitif bakteridir. Standart *E. coli* analizinde inkübasyon sıcaklığı 45,5 °C'dır. 500 g dehidre besiyeri ile 3333 adet 10 mL besiyeri hazırlanabilir.

44.11. Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293)

İndol testi için kullanılan hazır çözeltidir. 100 mL şişe içeriği ile standart olarak 100 test yapılabilir. İndol testi Fluorocult LST Broth ve Fluorocult LMX Broth ile ReadyCult Coliforms besiyerlerinde doğrudan yapılabilir (bakınız; Ek B 11).

44.12. Fluorocult LST Broth (Merck 1.12588)

Bileşimi, ISO 11866'ya uygun olup, Tryptose 20,0 g/L; Lactose 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sodium Lauryl Sulfate 0,1 g/L; K₂HPO₄ 2,75 g/L; KH₂PO₄ 2,75 g/L; L-Tryptophane 1,0 g/L; MUG 0,1 g/L şeklindedir. LST Broth+MUG besiyeri "Fluorocult LST Broth" ticari adı ile de anılmaktadır. Dehidre besiyeri 36,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 6,8±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Bileşimde bulunan lauryl sulfate refakatçi floranın gelişimini baskımlarken yüksek düzeyde bulunan besin maddeleri ve fosfat tampon "laktozu yavaş kullanan" koliform bakterilerin dahi hızlı gelişimini ve fazla miktarda gaz çıkışını sağlar. Gaz çıkışı Durham tüplerinde gaz birikmesi ile belirlenir. Gaz pozitif olan tüpler koliform grup olarak işaretlenir, bunlar 366 nm uzun dalga boylu UV el lambası (Merck 1.13203) ile loş bir ortamda kontrol edilir. Floresan ışınım görülen tüpler *E. coli* olarak işaretlenir (bakınız; Ek B 12). Besiyerinde bulunan triptofan nedeni ile doğrudan indol testi yapmak mümkündür. İndol testi besiyerine 1 mL Kovacs Indol Reagent (Merck 1.09293) ilavesi ile yapılabilir. Kuşkusuz, indol testi sadece floresan ışınım veren kültürlerle uygulanır ve bu şekilde sahte MUG pozitif sonuçlardan sakınılmış olunur. Floresanın belirginleştirilmesi için tüpe ilave edilen NaOH indol testini etkilemez. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyerinden 1369 tüp hazırlanır.

44.13. ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298)

Bakınız; 42.04. Bölüm.

44.14. Fluorocult LMX Broth (Merck 1.10620)

Bileşimi, Tryptose 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sorbitol 1,0 g/L; Tryptophane 1,0 g/L; K₂HPO₄ 2,7 g/L; KH₂PO₄ 2,0g/L; Lauryl Sulfate Sodium Salt 0,1 g/L; X-GAL 0,08 g/L; MUG 0,05 g/L; IPTG 0,1 g/L şeklindedir. Özellikle su analizlerinde kullanılır. Tek kuvvette 17,0 g/L; çift kuvvette 34,0 g/L olacak şekilde dehidre besiyeri damıtık su içinde eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renktedir. 25 °C'da pH'sı 6,8

$\pm 0,2$ 'dir. Oda sıcaklığında 6 ay depolanabilir. 15 °C altında depolanırsa besiyeri performansını etkilemeyen bir çökelti görülebilir. Bileşimde bulunan lauryl sulfatı refakatçi floranın gelişimini baskımlarken, fosfat tampon koliform bakterilerin hızlı gelişimini sağlar. Bu besiyerinin bileşiminde bulunan 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside (X-GAL), koliform grup bakteriler tarafından parçalanarak besiyerinin mavi–yeşil renk almasını sağlayan bir kromojenik substrattır. Rengi mavi–yeşil olan tüpler 366 nm uzun dalga boylu UV el lambası (Merck 1.13203) ile loş bir ortamda kontrol edilir (bakınız; Ek B 05 ve B 14). Floresan ışımaya görülen tüpler *E. coli* olarak işaretlenir. Tüp içinde aşırı asit gelişimi olur ise floresan net bir şekilde alınmayabilir. Bu gibi durumlarda tüpe 1 mL 1 N NaOH ilavesi ile floresan belirginleştirilir. Besiyerinde bulunan triptofan nedeni ile doğrudan indol testi yapmak mümkündür. Kuşkusuz indol testi sadece floresan ışınım veren tüplere uygulanır ve bu şekilde sahte MUG pozitif sonuçlardan sakınılmış olunur. Floresanın belirginleştirilmesi için tüpe ilave edilen NaOH indol testini etkilemez. Fluorocult LMX Broth besiyerinde Durham tüpü kullanımına gerek olmaması bu besiyerine büyük bir kullanım kolaylığı sağlar. Gıda analizlerinde özellikle Gram pozitif refakatçi flora yoğun ise otoklavlama öncesinde 30 mg/L konsantrasyonda novobiosin ilavesinin besiyerinin selektivitesini artıracakğı belirtilmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyerinden 2941 tüp hazırlanır.

44.15. Envirocheck Contact C (Merck 1.02136)

Bakınız; 42.08. Bölüm.

44.16. Fluorocult Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.12587)

Bileşimi, Pepton 10,0 g/L; Lactose 10,0 g/L; Ox Bile 20,0 g/L; Brilliant Green 0,0133 g/L; L-Tryptophane 1,0 g/L; MUG 0,1 g/L şeklindedir. BGB Broth+MUG besiyeri "Fluorocult Brilliant Green Bile Broth" ve Fluorocult BRILA Broth isimleri ile de bilinir. Dehidre besiyeri 41 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilerek hazırlanır, amaca uygun olarak erlen ve/veya tüplere dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrasında 25 °C'da pH'sı $7,2 \pm 0,2$ 'dir. Tüplerde koliform bakterilerin tipik özelliğı olan laktozdan gaz oluşumunun belirlenmesi için Durham tüpü kullanılmasına gerek yoktur. İnokülasyon ve 37 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra 366 nm dalga boylu UV el lambası (Merck 1.13203) floresan ışımaya *E. coli* pozitif olarak değerlendirilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renktedir. Buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan brilliant green ve safra tuzları refakatçi floranın gelişimini baskımlarken, koliform grup bakterilerin laktozdan gaz oluşturması gelişme ve Durham tüpünde gaz birikmesi ile belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,1 litre besiyeri hazırlanır.

45. *E. coli* O157:H7 Serotipi Analiz Malzemesi

45.01. mTS Broth (Merck 1.09205)	273
45.02. mEC Broth (Merck 1.14582)	273
45.03. SMAC Agar (Merck 1.09207)	274
45.04. SMAC Agar CT Katkısı (Merck 1.09202)	274
45.05. Singlepath <i>E. coli</i> O157 Test Kiti (Merck 1.04141)	275
45.06. CAYE Broth Base (Merck 1.00060)	275
45.07. CAYE Broth Supplement (Merck 1.00051)	276
45.08. Duopath Verotoxins (Merck 1.04144)	276

45.01. mTS Broth (Merck 1.09205)

Bileşimi, Peptone from Casein 17,0 g/L; Soya Peptonu 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Bile Salts no 3 1,5 g/L; D(+) Glucose 2,5 g/L; K₂HPO₄ 4,0 g/L; Novobiosin 0,02 g/L şeklindedir. Standart Tryptic Soy (CASO) Broth besiyerinde modifikasyon yapılarak hazırlanmıştır, ancak standart EC Broth, mEC Broth besiyerinde olduğu gibi standart CASO (Tryptic Soy) Broth besiyerine ilaveler yapılarak mTSB besiyeri elde edilemez. 33,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde eritilerek hazırlanan besiyeri 225 mL olacak şekilde erlenlere dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renkte olup, 2–8 °C'da 6 ay stabilitesini korur. Novobiosin doğrudan besiyeri bileşiminde olduğu için otoklav sonrası bir katkı ilavesi söz konusu değildir. Besiyerine standart uygulamada 25 g (ya da mL) gıda maddesi ilave edilip 35–37 °C'da 18–24 saat ve tercihen çalkalanarak inkübe edilir, buradan alınan 0,1 mL kültür doğrudan ya da seyreltilerek selektif bir katı besiyerine sürülür. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 225 mL'lik 67 adet erlen hazırlanabilir.

45.02. mEC Broth (Merck 1.14582)

Bileşimi, Peptone 20,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Bile Salts no 3 1,12 g/L; Lactose 5,0 g/L; K₂HPO₄ 4,0 g/L; KH₂PO₄ 1,5 g/L; Novobiosin 0,02 g/L şeklindedir. Standart EC Broth besiyerinden farkı safra tuzlarının miktarının azaltılmış olması ve novobiosin ilave edilmiş olmasıdır. Bu nedenle standart EC Broth besiyerine novobiosin eklenerek bu besiyeri elde edilemez. Safra tuzları konsantrasyonunun azaltılmış olması nedeni *E. coli* O157:H7 serotipinin *E. coli* tip 1'e göre safra tuzlarına daha az dirençli olmasıdır. 36,7 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde eritilerek hazırlanan besiyeri 225 mL olacak şekilde erlenlere dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 6,9±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı–portakal renkte olup, 2–8 °C'da 6 ay

stabilitesini korur. Novobiosin doğrudan besiyeri bileşiminde olduğu için otoklav sonrası bir katkı ilavesi söz konusu değildir. Besiyerine standart uygulamada 25 g (ya da mL) gıda maddesi ilave edilip, 35–37 °C'da 18–24 saat ve tercihen çalkalanarak inkübe edilir, buradan alınan 0.1 mL kültür doğrudan ya da seyreltilerek selektif bir katı besiyerine sürülür. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 225 mL'lik 60 adet erlen hazırlanabilir.

45.03. SMAC Agar (Merck 1.09207)

Bileşimi, Peptone 20,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Bile Salts no 3 1,5 g/L; Sorbitol 10,0 g/L; Crystal violet 0,001 g/L; Neutral red 0,03 g/L; Agar 15,0 g/L şeklindedir. ISO 16654 ve FDA başta olmak üzere pek çok uluslararası standarda uygundur. Safra tuzları ve kristal viyole Gram pozitif mikrobiyel florayı önemli ölçüde inhibe eder. *E. coli* O157:H7 serotipinin sorbitol negatif olması nedeni ile standart MacConkey Agar besiyeri bileşiminden laktoz çıkartılmış, yerine sorbitol ilave edilmiştir. Dolayısı ile sorbitol negatif olan bakteriler bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturur. *E. coli* O157:H7 analizinde doğrudan SMAC Agar besiyeri kullanılabilirse de refakatçi floranın yoğun baskılaması sonucunda sahte negatif sonuç alınabilir. Bu nedenle besiyeri genellikle CT katkısı ile desteklenerek kullanılmaktadır. Dehidre besiyeri 51,5 g/L konsantrasyonda ısıtılarak damıtık su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH 7,1±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir. CT katkısı (Merck 1.109202) ilave edilmesi için 1 şişe katkı üzerine 1 mL steril damıtık su konulup karıştırılır. Bu miktar 500 mL besiyeri için yeterlidir. Bu nedenle pratik uygulamada SMAC Agar besiyeri 25,8 g/500 mL olacak şekilde hazırlanır. Otoklav sonrasında 45 °C'a soğutulup 500 mL bazal besiyeri için 1 şişe katkı ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına 12,5 mL/Petri olacak şekilde dökülür. Selektif zenginleştirme kültüründen doğrudan ya da seyreltilerek alınan 0,1 mL besiyeri üzerine yayılır, ya da öze ile sürme yapılır. 35–37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda sorbitolü kullanamayan *E. coli* O157:H7 ve diğer bakteriler renksiz koloni oluştururken (bakınız; Ek B 15), sorbitol pozitif olanlar pH indikatörü olan nötral red nedeni ile kırmızı koloni oluştururlar. 500 g olan dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri hesabı ile 775 adet Petri hazırlanabilir. Bu miktar için gereken CT katkısı 19 şişedir. Bu katkı 16 şişe/kutu olarak pazarlanmaktadır.

45.04. SMAC Agar CT Katkısı (Merck 1.09202)

Her bir şişede 0,025 mg cefixim ve 1,25 mg potasyum tellurit vardır. Otoklavlanıp, 45 °C'a soğutulmuş 500 mL SMAC Agar besiyerine 1 şişe katkı ilave edilir. Bu amaçla katkı şişesine 1 mL steril damıtık su ilave edilip, karıştırılır ve bu karışım SMAC Agar besiyerine ilave edilir. Bu katkı LST Broth besiyerine ½ şişe/500 mL

hesabı ile ilave edilerek *E. coli* O157:H7 için selektif ön zenginleştirme amacı ile de kullanılmaktadır. 16 şişelik ambalajda paketlenmektedir.

45.05. Singlepath *E. coli* O157 Test Kiti (Merck 1.04141)

Singlepath *E. coli* O157, *E. coli* O157'nin hızlı analizi için kullanılan immun akış prensibi ile hazırlanmış immunolojik bir test kitidir. AOAC tarafından onaylanmış ve sertifikaya edilmiştir. Selektif zenginleştirme besiyeri kültüründen cam bir tüpe alınan 1–2 mL örnek ya da CT–SMAC Agar gibi selektif bir besiyerinden alınan koloninin 1–2 mL su içindeki suspansiyonu kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına getirilir. Sonra buradan 160 µL alınıp kitin örnek gözüne aktarılıp, oda sıcaklığında 20 dakika bırakılır. Bu süre içinde kitin "C" kontrol penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. "T" test penceresinde de oluşan kırmızı şerit örnekte *E. coli* O157 varlığını gösterir (bakınız; Ek A 08). Duyarlılığı %97,0 ve spesifikliğı %98,4 olarak belirlenmiştir. Ön zenginleştirme aşamasından sonra toplam 35–40 dakika içinde sonucu doğrudan *E. coli* O157 serotipi olarak verdiği için hızlı kit olarak değerlendirilir. Bu kit CT–SMAC Agar besiyerindeki renksiz (sorbitol negatif) kolonilerin *E. coli* O157 olarak doğrulanmasında kullanılabilir ve doğrudan mTS Broth ya da mEC Broth zenginleştirme kültürlerinden doğrudan test amacı ile de kullanılabilir. Eğer doğrudan mTS Broth ya da mEC Broth gibi bir selektif zenginleştirme besiyerinden örnek alınmış ise pozitif sonuç alınan zenginleştirme kültürlerinden CT–SMAC Agar besiyerine sürme yapılarak tipik kolonilerin elde edilmesi önerilir. Bu kit ile elde edilen pozitif sonucun sadece *E. coli* O157 serotipi olduğu unutulmamalı, *E. coli* O157:H7 serotipi doğrulaması için H7 antiserumu kullanılması gerektiğı ve/veya Verotoksin belirlenmesi gerektiğı unutulmamalıdır. Bir pakette 25 analiz kiti vardır.

45.06. CAYE Broth Base (Merck 1.00060)

Verotoksin üretme potansiyelindeki *E. coli* izolatlarının Verotoksin (VT1 ve/veya VT2) üretip üretmediğinin belirlenmesi için kullanılan bir besiyeridir. Genel olarak CT-SMAC Agar besiyerinden *E. coli* O157 analizi ile elde edilen koloniler bu besiyerinde inkübe edildikten sonra Duopath Verotoxins test kiti (Merck 1.04144) uygulanır. Bileşimindeki casaminoasitler ve maya ekstraktı verotoksin oluşturan *E. coli* 'lerin gelişmesini, iz elementler ve yüksek pH verotoksin oluşumunu destekler. Bileşimi, Casaminoacids 20,0 g/L; Yeast Extract 6,0 g/L; D(+) Glucose 2,5 g/L; NaCl 2,5 g/L; K₂HPO₄ 8,71 g/L; MgSO₄ 0,05 g/L; MnCl 0,005 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 7,95 / 200 mL damıtık su içinde kaynatılarak ve sürekli karıştırılarak çözülür, otoklavda 121 °C'a 15 dakika sterilize edilir. Oda sıcaklığına soğutulup, aseptik koşullar altında 1 mL steril damıtık su ile çözülmüş 1 şişe CAYE Broth Supplement (Merck 1.00051) ilave edilir, karıştırılıp steril tüplere

1'er mL olacak şekilde dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık kahverengidir. 25 °C'da pH'sı 8,5±0,2'dir. Tüplere dağıtım sırasında besiyeri sürekli karıştırılmalıdır. Tüplerde presipitat oluşması besiyeri performansını etkilemez. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12.578 adet 1 mL tüp hazırlanabilir. Bir pakette 16 şişe katkı olduğuna göre bir kutu dehidre besiyeri için 4 kutu katkı gereklidir. Katkının raf ömrü besiyerinden daha kısadır, stoklarda bu özellik dikkate alınmalıdır.

45.07. CAYE Broth Supplement (Merck 1.00051)

CARBADOX adı ile de anılır. Bileşimi, her şişede 10 µg verotoksin indükleyici şeklindedir. *E. coli* O157:H7 ve diğer verotoksin üretici serotiplerin gelişmesi sırasında verotoksin üretimini ve salgılamasını destekler. Şişe içeriği 1 mL steril damıtık su ile çözülür. Sterilize edilip, 45 °C'a soğutulmuş 100 mL Brain Heart Agar besiyerine ya da sterilize edilip oda sıcaklığına soğutulmuş 200 mL CAYE Broth besiyerine ilave edilir. 1 pakette 16 şişe vardır.

45.08. Duopath Verotoxins (Merck 1.04144)

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) serotipleri tarafından oluşturulan verotoksinlerin belirlenmesi için immün akış prensibi ile çalışan immunokromatografik hızlı bir test kitidir. VT1 ve VT2 ayrı ayrı belirlenir. Örnek penceresine 160 µL kültür ilave edildikten sonra 20 dakika içinde kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşur. Aynı süre içinde VT1 penceresinde kırmızı şerit oluşması VT1 toksinin varlığını, VT2 penceresinde kırmızı şerit oluşması ise VT2 toksinin varlığını gösterir (bakınız; Ek A 09). Bazı EHEC suşları sadece bir toksin oluştururken, bazıları her ikisini de oluşturur. 1 pakette 25 test kiti vardır.

46. Toplam Enterobacteriaceae Analiz Malzemesi

46.01. VRBD Agar (Merck 1.10275)	276
46.02. Enterobacteriaceae Enrichment (EE) Broth (Merck 1.05394)	277

46.01. VRBD Agar (Merck 1.10275)

ISO 5552, ISO 7402 ve ISO 21528'e uygun olarak bileşimi, Peptone 7,0 g/L; Yeast Extract 3,0 g/L; D(+) Glucose 10,0 g/L; NaCl 5 g/L; Ox Bile (Bile Salt Mixture)

1,5 g/L; Neutral Red 0,03 g/L; Crystal Violet 0,002 g/L; Agar 13 g/L şeklindedir. Violet Red Bile Glucose (VRBG) olarak da bilinir. Dehidre besiyeri 39,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde karıştırılarak kaynatılır ve kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, soğuyunca steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı $7,3 \pm 0,2$ 'dir. VRBD Agar besiyerinin aşırı ısıtılmasından kaçınılmalıdır. Aşırı ısıtma selektiviteyi azaltır. Kaynar su banyosundaki ısı işlem etkinliğinin sağlanması için besiyerinin 250 mL'den fazla hacimlerde hazırlanmaması önerilir. Önceden 0,5 litre erlen içine 250 mL damıtık su konulup ağzı kapatılarak otoklavda sterilize edilmesi ve besiyerinin bu erlende hazırlanıp eritilmesi önerilir. Hazırlanmış besiyeri parlak ve koyu kırmızı-kahve renklidir. Besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole başta Gram pozitifler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini inhibe ederken, glikoz pozitif bakterilerin varlığı pH indikatörü ile koloni renginin kırmızıya dönüşmesi ve safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile belirlenir. Dolayısıyla 30–32 ya da 35–37 °C'da 18–24 saat süren inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler Enterobacteriaceae familyası üyeleri olarak sayılır. *Aeromonas* gibi Enterobacteriaceae üyesi olmayan bazı refakatçi bakteriler de benzer reaksiyon verir. Buna bağlı olarak rasgele seçilmiş 5 tipik koloninin oksidaz testi ile (Merck 1.13300) doğrulanması önerilir. Enterobacteriaceae familyası üyeleri oksidaz negatiftirler. 12,5 mL/Petri kutusu hesabı ile 1 kutu (500 g) dehidre besiyerinden 1012 adet Petri kutusu hazırlanır. Genel olarak ekimden sonra 15 dakika oda sıcaklığında kendi halinde bekletilen Petri kutularına ikinci kat olarak yine VRBD besiyerinden 10 mL kadar dökülüp, katılaştıktan sonra inkübasyon önerilmektedir.

46.02. Enterobacteriaceae Enrichment (EE) Broth (Merck 1.05394)

Bileşimi, Peptone 10,0 g/L; D(+) Glucose 5,0 g/L; Ox bile, dried 20,0 g/L; Brilliant green 0,0135 g/L; Na₂HPO₄ 8,0 g/L; KH₂PO₄ 2,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri tek kuvvet için 45 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde çözülür, tüplere dağıtılıp, 121 °C'da 5 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası besiyeri parlak ve yeşil renkli, 25 °C'da pH'sı $7,2 \pm 0,2$ 'dir. Refakatçi flora brilliant green ve safra tuzları ile inhibe edilir. Glikoz tüm Enterobacteriaceae üyelerinin gelişimini destekler. Besiyerinin yüksek tamponlama kapasitesi gelişen bakterilere oluşan asidin olumsuz etkisini engeller. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile tek kuvvette olmak üzere 1111 adet 10 mL'lik tüp hazırlanır.

47. Maya – Küf Analiz Malzemesi

47.01. Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar (Merck 1.00467)	278
47.02. Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (Merck 1.16000)	278
47.03. Dichloran Glycerol Agar (DG-18) Agar (Merck 1.00465)	279
47.04. %50 Glikoz Broth	279
47.05. Ozmofil Maya Besiyeri	279
47.06. Ozmotolerant Maya Besiyeri	280
47.07. Sabouraud %2 Dextrose Broth (Merck 1.08339)	280
47.08. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (Merck 1.00466) ...	280
47.09. Potato Dextrose Agar (Merck 1.10130)	281
47.10. OGYE Agar Base (Merck 1.05978)	281

47.01. Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar (Merck 1.00467)

Bileşimi, Mycological Peptone 5,0 g/L; Glucose 10,0 g/L; KH_2PO_4 1,0 g/L; MgSO_4 0,5 g/L; Rose Bengal 0,05 g/L; Chloramphenicol 0,1 g/L; Agar 15,5 g/L şeklindedir. Dehidre RBC Agar besiyeri 32,2 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritilir. Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışı yaklaşık 50 °C'a soğuduğunda steril Petri kutularına 12,5 mL olacak şekilde dökülür. Hazırlanmış besiyeri pembe-kırmızı renktedir ve 25 °C'da pH'sı $7,2 \pm 0,2$ 'dir. Hazırlanmış besiyeri buzdolabında ve karanlıkta olmak kaydı ile 1 hafta depolanabilir. Bu yüzden gerekenden fazla besiyeri hazırlanmamalıdır. Besiyeri bileşimindeki chloramphenicol bakterilerin gelişimini baskımlarken, rose bengal küf hücrelerinin içine girerek bunların aşırı gelişmesini baskılar. İnkübasyonun karanlıkta yapılması önerilmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL olmak üzere 1242 Petri kutusu hazırlanabilir. Merck RBC Agar besiyerinde antibiyotik dehidre besiyeri içine ilave edilmiş olduğu için hazırlama sırasında ilave bir katkı yoktur.

47.02. Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (Merck 1.16000)

Bileşimi, Yeast extract 5,0 g/L; D(+) Glucose 20,0 g/L; Chloramphenicol 0,1 g/L; Agar 14,9 g/L şeklindedir. Dehidre YGC Agar besiyeri 40,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritilir. Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrası 50 °C'a soğuduğunda steril Petri kutularına 12,5 mL olacak şekilde dökülür. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF) tarafından süt ve ürünlerinde maya ve küf sayımı için önerilmektedir. Besiyeri bileşimindeki chloramphenicol bakteri gelişmesini engeller. Hazırlanmış besiyeri serin yerde olmak kaydı ile 1 ay depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri olacak şekilde 1000 Petri kutusu hazırlanır. Merck YGC Agar besiyerinde (bakınız; Ek B 16)

antibiyotik dehidre besiyeri içine ilave edilmiş olduğu için hazırlama sırasında ilave bir katkı yoktur. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsıdır, 25 °C'da pH'sı 6,6±0,2'dir.

47.03. Dichloran Glycerol Agar (DG-18) Agar (Merck 1.00465)

Bileşimi, Peptone 5,0 g/L; Glucose 10,0 g/L; KH₂PO₄ 1,0 g/L; Dichloran 0,002 g/L; MgSO₄ 0,5 g/L; Chloramphenicol 0,1 g/L; Agar 15,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 31,6 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, üzerine 175 mL gliserol (Merck 1.04092) ilave edilip, tekrar karıştırılır ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında 45–50 °C'a soğuyan besiyeri Petri kutularına yaklaşık 12,5 mL olacak şekilde dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı olup, 2–8 °C'da ve karanlıkta olmak üzere 1 hafta depolanabilir. Bu nedenle gereğinden fazla hazırlanmamalıdır. Otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı 5,6±0,2'dir. Bileşimdeki chloramphenicol bakterilerin gelişimini baskılar. İlave edilen gliserol ise su aktivitesini 0,99'dan 0,95'e düşürür ve böylece kseroofil küflerin gelişimi sağlanır. Bu besiyeri özellikle kuru ve yarı kuru gıdalardaki kseroofil küflerin sayımı ve /veya aranması için kullanılır.

47.04. %50 Glikoz Broth

Hazır ticari besiyeri değildir. Ozmofilik–ozmotolerant mayaların analizinde kullanılan bu çözeltilinin hazırlanması için önce erlene 100 mL su konulur, su seviyesi işaretlenir, su boşaltılıp 50 g glikoz (dextrose monohidrat; Merck 1.08342) ve 0,5 g yeast extract (maya ekstraktı; Merck 1.03753) tartılır, üzerine işaretli yere kadar damıtık su konulur ve ısıtılarak eritilir. Tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Glikozun monohidrat formda olması önemli değildir. EMS yöntemine göre bu besiyerinde ozmofilik ve ozmotolerant mayalar beraberce sayılır.

47.05. Ozmofil Maya Besiyeri

Besiyeri bileşimi, Fructose (Merck 1.05323) 300 g; Glucose (Merck 1.08342) 300 g; Yeast extract (Merck 1.03753) 10 g; agar (Merck 1.01613) 10 g; damıtık su 380 mL şeklindedir. Bileşenler ısıtılarak eritilir, otoklavda 110 °C'da 10 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında Petri kutularına dökülür. IFU'ya göre ozmofilik ve ozmotolerant mayalar ayrı besiyerlerinde analiz edilir. Bu besiyerinde ozmotolerant maya gelişemez.

47.06. Ozmotolerant Maya Besiyeri

Besiyeri bileşimi, Fructose (Merck 1.05323) 200 g; Glucose (Merck 1.08342) 200 g; maya ekstraktı (Merck 1.03753) 10 g; agar (Merck 1.01613) 10 g; damıtık su 580 mL şeklindedir. Bileşenler ısıtılarak eritilir, otoklavda 110 °C'da 10 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında Petri kutularına dökülür.

47.07. Sabouraud %2 Dextrose Broth (Merck 1.08339)

Bileşimi, Peptone from meat 5,0 g/L; Peptone from Casein 5,0 g/L; D(+) Glucose 20,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 30 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde çözülüp, erlen ve/veya tüplere dağıtılır ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Bileşimde bakteriyel gelişmeyi engelleyen herhangi bir inhibitör madde yoktur, bakteri gelişimi sadece 5,6 olan düşük pH ile engellenir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı-kahve rengindedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 16,6 litre besiyeri hazırlanır.

47.08. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (Merck 1.00466)

Bileşimi, Peptone 5,0 g/L; Glucose 10,0 g/L; KH_2PO_4 1,0 g/L; dichloran 0,002 g/L; MgSO_4 0,5 g/L; Rose Bengal 0,025 g/L; chloramphenicol 0,1 g/L; agar 15,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 31,6 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav çıkışı yaklaşık 50 °C'a soğuduğunda Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri pembe renklidir ve 25 °C'da pH'sı $5,6 \pm 0,2$ 'dir. Buzdolabı koşullarında ve karanlıkta 1 hafta depolanabilir. Bu nedenle gereğinden fazla hazırlanmamalıdır. Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar (Merck 1.00467)'ın modifiye edilmiş şeklidir. Bileşimine dichloran ilave edilmiş, pH düşürülmüş ve rose bengal konsantrasyonu yarıya indirilmiştir. Bu şekilde mayalar ve bakteriler için daha iyi bir inhibisyon sağlanır, küf kolonilerinin yayılması önlenerek sayımın daha iyi yapılması sağlanır. Buna karşılık, bazı küfler bu besiyerinde gelişemeyebilir. Bu nedenle toplam küf florasının belirlenmesi için paralel olarak Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar (Merck 1.00467) besiyerinin de kullanılması önerilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/ Petri kutusu hesabı ile 1265 Petri kutusu hazırlanır.

47.09. Potato Dextrose Agar (Merck 1.10130)

Bileşimi, Patates infüzyonu 4,0 g/L; D(+) Glucose 20,0 g/L; agar 15,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 39 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, 121 °C'da otoklavda 15 dakika sterilize edilir ve steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı-kahve renklidir ve buzdolabında 2 ay depolanabilir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı $5,6 \pm 0,2$ 'dir. Asitlendirme isteniyor ise (pH yaklaşık 3,5) otoklav sonrasında su banyosunda tutulan besiyeri sıcaklığı 45-50 °C'a düştüğünde tercihen filtre ile ya da otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiş %10 tartarik asitten (Merck 1.00802) 14 mL ilave edilir. Asitlendirilmiş besiyeri tekrar eritilemez. Analiz edilecek örnekte refakatçi flora olarak bakteri yükü fazla değilse ve/veya önemli değil ise PDA besiyeri asitlendirilmeden de kullanılabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1040 Petri kutusu hazırlanır

47.10. OGYE Agar Base (Merck 1.05978)

Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar besiyerinin bileşimi, Yeast Extract 5,0 g/L; Glucose 20,0 g/L; Agar 12,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 500 mL damıtık su içinde 18,5 g olacak şekilde ısıtılarak eritilip otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası 45–50 °C'a soğutulup, 10 mL steril damıtık su ile çözündürülmüş 1 şişe OGYE katkısı (Merck 1.09877) ilave edilir. Karıştırılıp, Petri kutularına 12,5 mL/Petri olacak şekilde dökülür. OGYE katkısı her şişede 0,05 g Oxytetracycline olacak şekilde 15 şişelik paketlerde pazarlanır. Bu besiyeri ISO 13681 (et ve ürünlerinde maya ve küf sayımı) ve ISO 6611 (süt ve ürünlerinde maya ve küf sayımı) standartlarına uygundur (bakınız; Ek B 55). Hazırlanmış besiyeri berrak, ve açık sarımsı–kahve rengindedir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı $6,6 \pm 0,2$ 'dir. Bileşimdeki oksitetrasiklin bakteri gelişimini engeller. 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 12,5 mL/Petri kutusu hesabı ile 1081 Petri kutusu hazırlanabilir. OGYE selektif katkısı şişe/500 mL şeklinde kullanıldığına göre 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile (15 şişe olan) 2 kutu selektif katkı kullanılır.

48. *Staphylococcus aureus* Analiz Malzemesi

48.01. Baird–Parker Agar Base (Merck 1.05406)	282
48.02. Yumurta Sarısı–Tellurit Emülsiyonu (Merck 1.03785)	283
48.03. Bactident Coagulase (Merck 1.13306)	283
48.04. Giolitti–Cantoni Broth Base (Merck 1.10675)	283
48.05. Potasyum tellurit trihidrat (Merck 1.05164) Çözeltisi	284

48.01. Baird–Parker Agar Base (Merck 1.05406)

Bileşimi, Peptone from Casein 10,0 g/L; Meat extract 5,0 g/L; Yeast extract 1,0 g/L; sodium pyruvate 10,0 g/L; glycine 12,0 g/L; lithium chloride 5,0 g/L; agar 15,0 g/L şeklindedir. 58,0 g dehidre besiyeri 950 mL damıtık su içinde 1–2 dakika kaynatılarak tümüyle çözündürülür ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Bazal besiyeri 45 °C'a soğutulur ve manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılırken üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 mL yumurta sarısı-tellurit (Egg–yolk tellurit; Merck 1.03785) emülsiyonu ilave edilip, standart 9 cm çaplı steril Petri kutularına 12,5'er mL ve/veya büyük 14 cm çaplı steril Petri kutularına 50'şer mL dökülür. Analiz edilecek örnekte *Proteus* kontaminasyonunun yüksek düzeyde olduğundan endişe ediliyor ise otoklav sonrası 50 mg/L konsantrasyonda olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş sulphamethazine ilavesi önerilmektedir. Hazırlanmış besiyeri opalesent (meneviş, yanar döner) sarımsı-kahve renkte olup 25 °C'da pH'sı 6,8±0,2'dir. Petri kutuları stretch filme sarılarak buzdolabının alt raflarında 2 aya kadar depolanabilir. Baird–Parker Agar besiyeri refakatçi floranın inhibisyonu için lityum klorür ve tellurit içerirken besiyeri bileşimindeki piruvat ve glisin stafilokokların gelişimini selektif bir şekilde stimüle eder. *S. aureus* kolonileri lipoliz ve proteoliz sonucunda koloni etrafında tipik zon ve halka oluşturmaları, tellurit telluriyuma indirgenmesi sonucunda siyah koloni oluşturmaları olmak üzere 2 tipik karakteristik özellik ile belirlenirler (bakınız; Ek B 17). 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda *S. aureus* 1–1,5 mm çapında siyah, parlak konveks koloniler oluşturur. Koloni çapı 48 saat inkübasyondan sonra 1,5–2,5 mm olur. Yumurta sarısı reaksiyonu ve tellurit indirgenmesi genellikle pozitif koagülaz reaksiyonu ile beraberce oluşur. Baird–Parker Agar besiyerinde yumurta sarısı yerine kan plazması ilavesi ile hemoliz testi de yapılabilir. İnsan kaynaklı *S. aureus* α-hemoliz yaparken sığır kaynaklı olanlar β-hemoliz yaparlar. Hemoliz reaksiyonu besiyerinin 37 °C'da 24 veya 48 saat inkübasyonu ve sonra oda sıcaklığında veya tercihen buzdolabında 1 gece bırakılması ile daha kesin olarak saptanır. 500 g 1 kutu Baird–Parker Agar besiyeri ile yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu ilave edilmiş olmak üzere 689 adet standart 9 cm Petri kutusu (12,5 mL/Petri) veya 172 adet 14 cm çaplı büyük Petri kutusu (50 mL/Petri) hazırlanır. 500 g olan 1 kutu dehidre bazal Baird–Parker Agar besiyeri için 9 kutu 50 mL'lik yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu kullanılmaktadır.

48.02. Yumurta Sarısı–Tellurit Emülsiyonu (Merck 1.03785)

Baird–Parker Agar besiyeri katkısıdır. Egg-yolk tellurit ticari adı ile de bilinir. Bileşimi, 200 mL steril yumurta sarısı, 4,25 g NaCl (Merck 1.06404) ve 2,1 g potasyum tellurit ile 1 litreye tamamlayacak kadar steril damıtık sudur. Steril bir çözeltidir. Bununla beraber, sterilitesinin kontrol edilmesi tavsiye edilir. Bu amaçla standart şekilde hazırlanmış 1 adet Baird–Parker Agar besiyerinin kontrol olarak inkübe edilmesi yeterlidir. 50 mL şişe içeriği doğrudan 950 mL olarak hazırlanan Baird–Parker Agar besiyerine ilave edilir. Günlük uygulamada 1 şişe yumurta sarısı–tellurit emülsiyonunun tümü kullanılmayacak ise, kalan kısmın sterilitesinin korunmasına özen gösterilmelidir. Yumurta sarısı–tellurit emülsiyonu buzdolabı sıcaklığında korunmalıdır.

48.03. Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

EDTA ilave edilmiş liyofilize tavşan plazmasıdır. *S. aureus* tarafından oluşturulan koagülazın belirlenmesi içindir. İdeal olarak Brain–Heart Broth kültürü kullanılmalıdır. Brain–Heart Agar kültürü kullanılacak ise koloni 1 mL steril damıtık su içinde çözülüp kullanılabilir. Liyofilize tavşan plazması 3 mL steril damıtık su ile sulandırılıp steril küçük tüplere 0,3 mL olacak şekilde dağıtılır ve üzerine 0,1 mL kültür ilave edilip 37 °C'da inkübasyona bırakılır. Her saat tüpte pıhtılaşma olup olmadığı tüpü yavaşça eğerek kontrol edilir ancak bu kontrol sırasında tüpün fazla eğilmemesine ve karıştırılmamasına özen gösterilmelidir. Tüpte belirgin pıhtı oluşumu (%75 pıhtı) pozitif olarak değerlendirilir. 1 pakette 6 adet liyofilize şişe vardır. Her şişe 3 mL steril damıtık su ile sulandırılıp bundan 0,3 mL'si 1 örnek analizi için kullanılır. Buna göre 1 paket ile 60 test yapılabilir. Koagülaz kan plazmasını koagüle eden bir enzimdir. *S. aureus* tarafından oluşturulan koagülaz ve enterik toksin arasında yakın bir ilişki vardır. Buna göre koagülaz pozitif *S. aureus* 'un toksin oluşturma yeteneğinde olduğu kabul edilir.

48.04. Giolitti–Cantoni Broth Base (Merck 1.10675)

Bileşimi, Peptone from Casein 10,0 g/L; meat extract 5,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; lithium chloride 5,0 g/L; D(-) mannitol 20,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; glycine 1,2 g/L; sodium pyruvate 3,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 55 g/L olacak şekilde damıtık suda gerekirse ısıtılarak tümüyle çözündürülüp IDF'ye göre 18 X 180 mm büyük tüplere 19'ar mL, ISO'ya göre standart olarak 10'ar mL dağıtılır ve otoklavda 121 °C'da 20 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı–kahve renktedir, 25 °C'da pH'sı 6,9±0,2'dir. Otoklav çıkışında potasyum tellurit çözeltisi ilave edilmeden buzdolabının alt raflarında 2 haftaya

kadar depolanabilir. Depolanmış besiyeri kullanılacağı zaman içindeki havanın çıkması için önce kaynar su banyosunda 15 dakika kaynatılır. Oda sıcaklığındaki tüplere filtre ile sterilize edilmiş %1 potasyum tellurit trihidrat (Merck 1.05164) çözeltisinden 0,1'er mL eklenir ve bu ekleme yapıldığında besiyeri kullanılmalıdır. Potasyum tellurit zehirli bir maddedir ve bu çözelti çeker ocak içinde hazırlanmalıdır. Burada dikkat edilmesi gereken husus gerek IDF'ye göre 19 mL gerek ISO'ya göre 10 mL olan besiyerine %1'lik potasyum tellurit çözeltisinden 0,1 mL katılacağıdır. Giolitti-Cantoni Broth tüplerine 0,1'er mL potasyum tellurit eklenirken pipet asla ağızla değil puar ile kullanılmalı ve bu aktarma işlemi de çeker ocakta yapılmalıdır. Besiyeri bileşimindeki piruvat, glisin ve yüksek konsantrasyondaki mannitol stafilokokların gelişimini teşvik ederken refakatçi florada bulunan Gram negatifler lityum klorür, Gram pozitifler ise tellurit ile baskılanır. Mikrobokların baskılanması ise kısmen anaerobik inkübasyon ile sağlanır. Stafilokokların gelişimi besiyerindeki tellurit metalik telluriuma indirgenmesi sonunda oluşan siyah renk ile belirlenir (bakınız; Ek B 18). Giolitti-Cantoni Broth besiyeri gıdalarda EMS yöntemi ile *S. aureus* sayımı veya analiz edilen gıdanın belirli bir miktarında (hacim veya ağırlık) *S. aureus* 'un var/yok testi için kullanılır. Ekimden sonra tüplerin üzerine otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiş 2 mL steril sıvı parafin (Merck 1.07160) ilave edilerek kısmi bir anaerobik ortam sağlanır. 37 °C'da 18–24 saat inkübasyondan sonra siyahlaşma olan tüplerden Baird–Parker Agar (Merck) besiyerine sürme yapılarak sonuçlar doğrulanır. 500 gramlık 1 kutu dehidre Giolitti–Cantoni Broth ile 19 mL'lik 478, 10 mL'lik 908 tüp hazırlanabilir. 1 kutu 100 g potasyum tellurit trihidrat 209 adet 500 g Giolitti–Cantoni Broth besiyeri için yeterlidir. 1 litre sıvı parafin şişesi ile 500 tüpte kısmi anaerob ortam sağlanır. ISO tarafından düşük sayıdaki stafilokokların belirlenmesinde kullanılması önerilir.

48.05. Potasyum tellurit trihidrat (Merck 1.05164) Çözeltisi

S. aureus analizinde kullanılan Giolitti–Cantoni Broth (Merck 1.10675) için otoklav sonrası ilave edilen bir katkıdır. Genel kullanım 0,052 g/L son konsantrasyon şeklindedir. Buna göre %1'lik çözeltisinden 19 mL tüplere 0,1 mL; 90 mL'ye 0,5 mL ve 225 mL'ye 1,20 mL ilave edilir. Bununla beraber, ISO örneğinde görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlar da söz konusudur. Potasyum tellurit zehirli bir maddedir. Çeker ocak altında hazırlanmalı, vida kapaklı şişelerde saklanmalı ve besiyerine ilave sırasında standart pipet mutlaka puar ile kullanılmalıdır. İdeal olarak otomatik pipet kullanılarak bu çözelti besiyerine aktarılmalıdır.

49. *Salmonella* Analiz Malzemesi

49.01. Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)	285
49.02. Salmosyst Broth (Merck 1.10153)	285
49.03. Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth (Merck 1.07700)	286
49.04. Salmosyst Selective Supplement (Merck 1.10141)	286
49.05. Selenite Cystine Broth (Merck 1.07709)	286
49.06. Rambach Agar (Merck 1.07500)	287
49.07. Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar (Merck 1.10747)	288
49.08. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck 1.05287)	288
49.09. XLT4 Agar (Merck 1.13919)	289
49.10. Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)	289
49.11. MSRV Medium (Merck 1.09878)	290
49.12. Diasalm Medium (Merck 1.09803)	290
49.13. Urea Broth (Merck 1.08483)	291
49.14. Singlepath Salmonella (Merck 1.04140)	292
49.15. Lysine Iron Agar (Merck 1.11640)	292

49.01. Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)

Bileşimi, peptone 10,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Na₂HPO₄.12H₂O 9,0 g/L; K₂HPO₄ 1,5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 25,5 g/L olacak şekilde su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir, 500 mL erlenlere 225'er mL olacak şekilde ya da diğer hacimlerde uygun cam malzemeye dağıtılır ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renklidir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH 7,0±0,2'dir. Besiyeri bileşiminde bulunan fosfat tampon pH düşmesine karşı özellikle hasar görmüş olan bakterileri korur. Hazırlanmış besiyeri oda sıcaklığında 2 ay depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 87 adet 225 mL besiyeri hazırlanır. **Not:** Bu besiyeri ISO 6887 tarafından genel amaçlı bir seyreltme çözeltisi olarak da önerilmektedir. Bu besiyeri seyreltme amacı ile kullanılan "peptonlu su" hazırlanmasında kullanılabilir ancak, %1 ya da %0,1 peptonlu su hazırlamak için kullanılamaz. Bir diğer deyiş ile seyreltme amacı ile kullanılan Peptonlu Su bileşimi ile *Salmonella* analizinde ön zenginleştirme için kullanılan "Tamponlanmış Peptonlu Su" bileşimi çok farklıdır. Tamponlanmış Peptonlu Su canlandırma ya da ISO 6887'ye göre seyreltme amacı ile kullanılacak ise mutlaka 25,5 g/L konsantrasyonda hazırlanmalıdır.

49.02. Salmosyst Broth (Merck 1.10153)

Bileşimi, Peptone from Casein 5,0 g/L; Peptone from meat 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; CaCO₃ 10,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 25 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak iyice eritilir ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 500

mL erlenlere 225'er mL halinde bölünüp otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. 25 °C'da pH'sı 7,1±0,2'dir. Besiyeri dibinde kalsiyum karbonattan gelen beyaz renkli bir çökeltme olur. Kalsiyum karbonat pH düşmesine karşı özellikle hasar görmüş olan bakterileri korur. Hazırlanmış besiyeri oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Uzun süreli depolamalarda kalsiyum karbonatın erimesine bağlı olarak pH'da önemsiz bir yükselme görülebilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 88 adet 225 mL besiyeri hazırlanır. Genellikle Salmosyst Selective Supplement ile birlikte kullanılır.

49.03. Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth (Merck 1.07700)

Bileşimi, Peptone from soymeal 4,5 g/L; Magnesium chloride hexahydrate 28,6 g/L; NaCl 7,2 g/L; K₂HPO₄ 1,26 g/L; KH₂PO₄ 1,18 g/L; malachite-green 0,036 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 41,8 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak çözülür, standart deney tüplerine 10'ar mL olacak şekilde dağıtılır ve otoklavda 115 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH 5,2±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve koyu mavi renklidir. Buzdolabında en az 7 ay süre ile korunabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan malahit yeşili ve magnezyum klorür konsantrasyonları benzeri diğer besiyerlerine göre daha azdır. Bu konsantrasyonlar *Salmonella* 'nın 43 °C'daki inkübasyon sırasında gelişmesini artıracak düzeyde tutulmuştur. Aynı amaçla besiyeri bileşiminde soya peptonu bulunmaktadır. pH'nın 5,2 olması bu besiyerinin selektivitesini yükseltir. Besiyerine 40 mg/Litre olacak şekilde novobiosin katılmasının selektiviteyi artıracakı belirtilmektedir. Novobiosin filtre ile sterilize edilip, 45 °C'a soğutulmuş besiyerine ilave edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1162 adet 10 mL besiyeri hazırlanır ve dolayısı ile bu sayıda örnek analiz edilebilir.

49.04. Salmosyst Selective Supplement (Merck 1.10141)

Hazır ticari tablet şeklinde kullanılır. Her tabletin bileşimi Potassium tetrathionate 0,2 g; ox bile 0,08 g; brilliant green 0,0007 g; CaCO₃ 0,1 g şeklindedir. Selektif katkı bileşiminde bulunan potasyum tetratiyonat, safra tuzları ve brilliant green refakatçi floranın gelişimini engeller. 1 kutuda bulunan 250 adet tablet aynı sayıda örneğin analizi için kullanılabilir. Salmosyst Broth ile birlikte kullanılır.

49.05. Selenite Cystine Broth (Merck 1.07709)

Bileşimi, Peptone from Casein 5,0 g/L; L(-)-cystine 0,01 g/L; Lactose 4,0 g/L; Phosphate buffer 10,0 g/L; Sodium hydrogen selenite 4,0 g/L şeklindedir. 100 mL damıtık su içinde 2,3 g dehidre besiyeri gerekirse en çok 60 °C'a kadar ısıtılarak

      . Bu besiyeri otoklavlanmaz. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Eğer besiyeri hemen kullanılmayıp depolanacak ise filtre ile sterilize edilmeli veya tercihen gereken miktarlarda hazırlanmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık sarı renklidir, 25   C'da pH'sı 7,0  0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki selenit inkübasyonun ilk 12 saatine kadar koliform bakterilerin ve enterokokların gelişimini baskılar, daha sonra inhibisyon etkisi giderek azalır. Dehidre besiyeri 15   C altında depolanmalıdır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 217 adet 100 mL besiyeri hazırlanır ve dolayısı ile bu sayıda örnek analiz edilebilir.

49.06. Rambach Agar (Merck 1.07500)

Dehidre besiyeri bileşimi, Peptone 8,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sodium deoxycholate 1,0 g/L; Chromogenic mix 1,5 g/L; Propylene glycol 10,5 g/L; Agar 15,0 g/L şeklindedir. 1 şişe selektif katkı 500 mL erlende bulunan 250 mL damıtık suya ilave edilir, iyice eriyinceye kadar karıştırılır.   zerine 1 kutu dehidre besiyeri d  k    r ve 20 dakika süre ile kaynar su banyosunda bekletilir, bu sırada her 4-5 dakikada bir çalkalanır. Erlen i   çeperinde gözle görüşür parça kalmamalıdır. Rambach Agar besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Soğuk su banyosunda en geç 30 dakikada olacak şekilde besiyeri sıcaklığı 45–50   C'a indirilir. Tekrar çalkalanıp steril Petri kutularına 12,5'er mL d  k    r. Döküm sırasında Petri kutuları oda sıcaklığından daha fazla sıcaklıkta olmamalıdır. Besiyeri dökülmüş Petri kutuları besiyeri katılaştıktan sonra strech filim ile sarılarak buzdolabının en alt gözünde ve 6   C'ın altında olmamak üzere saklanır. Besiyeri 2 aydan uzun depolanmaz. Besiyeri kullanılmadan önce yüzeyi kontrol edilir, ıslak bir görüntü varsa kurutulur. Aşırı kurutma yapılmamalıdır. Hazırlanmış besiyeri opak ve pembe renklidir, 25   C'da pH'sı 7,3  0,2'dir. Rambach Agar bugün için kullanılan *Salmonella* izolasyon besiyerleri içinde başta *Proteus* olmak üzere refakatçi flora ile en iyi ayrımı sağlayan besiyerlerinden birisidir. Bu besiyerinde *Salmonella* kırmızı renkli koloni oluşturur iken *Proteus* ve *Shigella* renksiz sarımsı, koliform bakteriler mavi–yeşil veya mavi–mor renkli, *Pseudomonas* renksiz kırmızımsı koloni morfolojisi verir (bakınız; Ek B 20). *Salmonella*, besiyeri bileşimindeki propylen glyocol'den asit oluşturur ve pH indikatörü ile koloni renginin kırmızı olması sağlanır. Koliform grup bakterilerin *Salmonella* 'dan ayrımı için bileşimde kromojenik substrat vardır. Koliformlar için spesifik olan   -galactosidase enzimi ile bu kromojenik substrat parçalanır ve böylece koliformlar tipik mavi–yeşil renkli koloni oluşturur. 4 X 250 mL olan 1 kutu besiyeri ile 80 Petri kutusu hazırlanır.

49.07. Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar (Merck 1.10747)

ISO 6579'a uygundur. Bileşimi, Peptone from meat 10,0 g/L; Meat extract 5,0 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; Na₂HPO₄ 1,0 g/L; NaH₂PO₄ 0,6 g/L; Lactose 10 g/L; Sucrose 10 g/L; Phenol red 0,09 g/L; Brilliant green 0,0047 g/L; Agar 12,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 51,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda karıştırılarak eritilir ve steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri parlak ve kırmızı renkli olup, 25 °C'da pH'sı 6,9±0,2'dir. Refakatçi floranın gelişimi yükseltilmiş brilliant green konsantrasyonu ile baskılanır. Bu besiyerinde *Salmonella* kolonileri etrafı parlak kırmızı bir zon ile çevrili pembe–kırmızı renklidir (bakınız; Ek B 19). Bu görüntü koloninin laktoz ve sakkarozu kullanamadığını gösterir. *Proteus* (yayılmayan koloni), *Pseudomonas* (küçük ve kenarı tırtıllı koloni) türleri de bu morfolojiyi gösterir. Etrafı sarı bir zon ile çevrelenmiş sarı koloniler ise laktoz ve/veya sakkarozu kullanabilen *E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* türlerine ait olabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 776 adet Petri kutusu hazırlanabilir.

49.08. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck 1.05287)

Bileşimi, Yeast extract 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; D(+)xylose 3,75 g/L; Lactose 7,5 g/L; Sucrose 7,5 g/L; L(+)lysine 5,0 g/L; Sodium deoxycholate 1,0 g/L; Sodium thiosulfate 6,8 g/L; Ammonium iron(III) citrate 0,8 g/L; Phenol red 0,08 g/L; Agar 14,5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 55 g/L olacak şekilde damıtık su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda eritilir ve steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,4±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki tiyosülfat ve demir tuzu ile hidrojen sülfür oluşumu, ksiloz ve/veya laktoz ve/veya sakkarozun kullanımı pH indikatörü olan fenol red ile belirlenir. Lisinin dekarboksilasyonu ile kadeverin oluşması koloni etrafındaki pH yükselmesine bağlı olarak menekşe renkli bir zon ile görülür. Bu besiyerinin refakatçi flora üzerinde zayıf bir inhibitör etkisi vardır. *Salmonella* kolonileri besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli olurlar (bakınız; Ek B 21). *Shigella*, *Providencia*, *Pseudomonas* kolonileri de besiyeri ile aynı renkte ve yarı saydamdır ancak bunlarda siyah merkez oluşmaz. Sarı ve sarı zonlu koloniler koliform grup bakteriler, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Proteus* ve *Hafnia* kolonileridir. Ksiloz pozitif olan *Salmonella* Typhosa bu besiyerinde portakal–hafif opak koloni oluşturur. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 727 adet Petri kutusu hazırlanabilir.

49.09. XLT4 Agar (Merck 1.13919)

Bileşimi, Proteose peptone No. 3 1,6 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; L-lysine 5,0 g/L; xylose 3,75 g/L; Lactose 7,5 g/L; Sucrose 7,5 g/L; Ammonium-iron(III) citrate 0,8 g/L; Sodium thiosulfate 6,8 g/L; NaCl 5,0 g/L; Phenol-red 0,08 g/L; Agar 18,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 59 g/L konsantrasyonda damıtık suya katılır, üzerine 4,6 mL/L konsantrasyonda olacak şekilde XLT4 Agar katkısından (Merck 1.08981) eklenir. Kaynar su banyosunda tutularak eritilir. Eritme işlemi ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda yapılmamalıdır. Isıya oldukça duyarlı olan bu besiyeri 50 °C üzerinde 45 dakikadan fazla tutulmalı, 45 °C'a soğutulup, Petri kutularına dökülmelidir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızıdır, 25 °C'da pH'sı 7,4 ±0,2'dir. Bileşimindeki besin maddeleri *Salmonella* 'nın gelişimini teşvik ederken, Tergitol-4 ve Sodium tetra-decylsulfate refakatçi florayı inhibe eder. 35–37 °C'da 18–24 saat inkübasyondan sonra *Salmonella* kolonileri hidrojen sülfür oluşumuna bağlı olarak siyah renkli görülür (bakınız; Ek B 22). Bu besiyerinde *E. coli* ve *Proteus* türleri zayıf, *Enterobacter aerogenes* ve *Citrobacter freundii* iyi gelişir ve tümü sarı renkli koloni oluşturur. Selektif katkı %26–28 konsantrasyonda Sodyum tetradesil-sülfat bileşimindedir ve 100 mL ambalaj şişede pazarlanmaktadır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri hesabı ile 678 Petri kutusu hazırlanır. 1 şişe selektif katkı 2,5 kutu dehidre besiyeri için yeterlidir.

49.10. Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)

Bileşimi, Peptone from Casein 15,0 g/L; Peptone from meat 5,0 g/L; Meat extract 3,0 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Lactose 10,0 g/L; Sucrose 10,0 g/L; D(+) glucose 1,0 g/L; Ammonium iron(III) citrate 0,5 g/L; Sodium thiosulfate 0,5 g/L; Phenol red 0,024 g/L; Agar 12,0 g/L şeklindedir. 65 g/L konsantrasyonda olacak şekilde dehidre Triple Sugar Iron Agar besiyeri damıtık suya ilave edilir, kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak besiyerinin iyice erimesi sağlanır. Besiyeri henüz sıvı halde iken standart 16 X 160 mm tüplere 7'şer mL olarak dağıtılır, ve tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılır. Bu şekilde tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olmalıdır. Tüpler bu şekilde bekletilir, besiyeri katılaştıktan sonra tüpler strech filim ile sarılarak buzdolabının alt gözünde 2 aya kadar depolanır. Hazırlanmış besiyeri berrak kırmızı renklidir ve 25 °C'da pH'sı 7,4±0,2'dir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile her tüpte 7 mL olmak üzere 1098 identifikasyon tüpü hazırlanır. *Salmonella* yüzeyde kırmızı, dipte sarı ve siyah renk oluşturur. Bazen siyah renk sarı rengi kapatacak kadar yoğun olur. Besiyerinde gaz delikleri ve/veya gaz yarıkları *Salmonella* için tipiktir.

49.11. MSRV Medium (Merck 1.09878)

Bileşimi, Tryptose 4,59 g/L; Casein hydrolysate 4,59 g/L; NaCl 7,34 g/L; KH_2PO_4 1,47 g/L; Magnesium chloride anhydrous 10,93 g/L; Malachite green 0,037 g/L; Agar 2,7 g/L şeklindedir. Diğer besiyerlerinden farklı olarak 15,8 g dehidre besiyeri 500 mL damıtık su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda tutulur. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Besiyeri sıcaklığı 45 °C'a düştüğünde 1 mL steril damıtık su ile sulandırılmış olan 1 şişe MSRV Medium selektif katkısı (Merck 1.09874) ilave edilir, karıştırılıp steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık mavi renklidir, 25 °C'da pH'sı 5,6±0,2'dir. Buzdolabında 2 hafta süre ile depolanabilir. Diğer geleneksel *Salmonella* izolasyon besiyerlerine kıyasla MSRV Medium besiyerinin daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir. Bu besiyerinde *Salmonella* belirlemenin prensibi *Salmonella* serotiplerinin yarı katı besiyerinde hareket ederken opak hale oluşturmasıdır (bakınız; Ek B 23). Hareketli diğer refakatçi floranın hareketini magnezyum klorür, malahit yeşili ve novobiosin varlığı ile 42 °C'a yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı engeller. Besiyeri kullanılmadan önce oda sıcaklığında en az 1 saat tutularak yüzeyinin yeterince kuruması sağlanmalıdır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile her Petri kutusunda 12,5 mL olacak şekilde 1265 adet Petri hazırlanabilir. Bu besiyeri ile birlikte kullanılan MSRV Medium selektif katkısının 1 kutusunda 16 şişe vardır. Selektif katkının bileşimi 10 mg novobiosin/şişe olup, 1 mL steril damıtık su ile çözülür. Her şişe 500 mL besiyerine (40 Petri kutusu) ilave edileceğine göre 500 g olan 1 kutu dehidre bazal besiyeri için toplam 32 şişe (2 kutu) selektif katkı gereklidir. Dehidre besiyeri kullanım hacmine bağlı olarak stok selektif katkı miktarı planlanmalıdır. *Salmonella* hızlı analizi için kullanılan bu besiyerine 42 °C'da 16–20 saat inkübe edilmiş Tamponlanmış Peptonlu Su kültüründen 3 noktaya damlatma yapıp, Petri kutusu ters çevrilmeden 42 °C'da 24 saat inkübasyon yapılması, inkübasyonun bu süreyi geçmemesi önerilmektedir. Hasar görmüş *Salmonella* 'nın canlandırılması için ön zenginleştirme sırasında 2–3 saat süreli 37 °C'da inkübasyon ve sonra kalan sürenin 42 °C'da yapılması da önerilmektedir.

49.12. Diasalm Medium (Merck 1.09803)

Bileşimi, Peptone from Casein 13,5 g/L; Peptone from meat 13,5 g/L; Sucrose 7,5 g/L; Lactose 0,5 g/L; Ammonium iron(II) sulfate 0,2 g/L; Sodium thiosulfate 0,8 g/L; KH_2PO_4 1,47 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 23,3 g/L; Malachite green 0,037 g/L; Bromocresol purple 0,08 g/L; Agar 2,7 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 64 g/L konsantrasyonda olacak şekilde kaynar su banyosunda tümüyle eriyinceye kadar tutulur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. 45–47 °C'a soğutulup, 1 şişe MSRV katkısı (Merck 1.09874) ilave edilir. MSRV katkısı liyofilize formda olup, üzerine 1 mL

steril damıtık su ilave edilerek eritilir. Selektif katkının bileşimi 10 mg novobiosin/ şişe şeklindedir. Hazırlanmış besiyeri koyu yeşil renkli ve berraktır, 25 °C'da pH'sı 5,5±0,2'dir. Buzdolabı sıcaklığında 1 hafta depolanabilir. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında en az 1 saat tutularak yüzeyi kurutulur. Tamponlanmış Peptonlu suda ön zenginleştirme kültüründen besiyerinin tam ortasına 0,1 mL ya da 3 noktasına 0,03 mL damlatılır. Petri kutuları düz şekilde (taban üzerinde) 42 °C'da 12–18 saat inkübe edilir. İnkübasyon 24 saati geçmemelidir. Hareketli *Salmonella* damlatma yapılan yerin etrafında menekşe renkli bir zon ile yayılıcı koloni yapar. Bu zonun etrafında açık kahve–siyah renkli ikinci bir zon daha görülür (bakınız; Ek B 24). Koloninin yayılma göstermemesi ve gri–siyahımsı merkezli olması hareketsiz *Salmonella*, *Citrobacter freundii* ya da *Proteus* spp. olasılığı gösterir. Bu besiyeri yarı katı indol hareket (SIM Medium; Merck 1.05470) ile RVS Broth karışımına benzer. Yüksek konsantrasyondaki magnezyum klorür, novobiosin, malahit yeşili Gram negatif ve pozitif pek çok refakatçi florayı inhibe eder. Besiyerinin yarı katı olması hareketli *Salmonella* serotiplerinin yayılıcı koloni oluşturmalarını sağlar. Nadiren de olsa bazen *Salmonella* olmayan koloniler *Salmonella* kolonilerinin üzerinde gelişir. Bu nedenle yayılmış koloninin dış tarafından alınacak bir öze kültürün Rambach, XLT4 gibi selektif bir besiyerine sürülmesi önerilmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri hesabı ile 625 Petri hazırlanabilir. 1 paket (16 şişe) MSR/V katkısı 2 kutu Diasalm Medium için yeterlidir.

49.13. Urease Broth (Merck 1.08483)

Bileşimi, Yeast extract 0,1 g/L; KH₂PO₄ 9,1 g/L; Na₂HPO₄ 9,5 g/L; Urea 20,0 g/L; Phenol red 0,01 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 38,5 g/L olacak şekilde gerekirse ısıtılarak damıtık su içinde eritilir. Membran filtre ile sterilize edilip steril tüplere 3'er mL dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri berrak, portakal renkli ve 25 °C'da pH'sı 6,8±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki tek karbon kaynağı üre olup, üreyi kullanan bakteriler bu besiyerinde gelişme sonunda amonyak oluşturur ve ortamın alkali oluşmasına neden olur. Bu besiyeri üre pozitif olan *Proteus* ile üre negatif olan *Salmonella* 'nın ayrılması için kullanılır. 37 °C'da 48 saate kadar süren inkübasyon sonunda besiyerinin orijinal portakal kırmızısı renkten sarıya dönüşmesi negatif (*Salmonella*), kırmızıya dönüşmesi pozitif (*Proteus*) reaksiyon olarak değerlendirilir. Üre testi yapılırken 4 adet Urea Broth besiyeri hazırlanması, bunlardan birincisine bakteri inoküle edilmeden orijinal portakal kırmızısı rengin izlenmesi (şahit), ikincisine şüpheli kültür (test), üçüncüsüne negatif sonuç için üre negatif olan *E. coli*, dördüncüsüne pozitif sonuç için üre pozitif olan *Proteus* spp. inoküle edilmesi ve bu 4 tüpün beraberce inkübasyonu ve renk değerlendirilmesi gerekmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 2597 adet 5 mL tüp hazırlanır.

49.14. Singlepath Salmonella (Merck 1.04140)

Salmonella belirlenmesinde kullanılan immuno-kromatografi esaslı hızlı bir test kitidir. Tamponlanmış Peptonlu Su kültüründen 10 mL RVS Broth (Merck 1.07700) besiyerine 0,1 mL aktarılıp 41,5 °C'da 24 saat inkübasyon yapılır. Bu süre sonunda bu kültürden cam bir tüpe 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL Singlepath Salmonella kitine uygulanır. 20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde *Salmonella* olduğunu gösterir (bakınız; Ek A 11). Pozitif sonuç alındığında doğrulama için standart bir katı besiyerine sürme yapılarak sonucun doğrulanması önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuç alınırse analize devam etmenin gereği yoktur. Biyokimyasal testler ile *Salmonella* olduğu belirlenmiş izolatın serolojik olarak doğrulanması amacı ile de kullanılabilir. Bir pakette 25 test kiti vardır.

49.15. Lysine Iron Agar (Merck 1.11640)

Bileşimi, Peptone from meat 5,0 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; D(+) glucose 1,0 g/L; L-lysine monohydrochloride 10,0 g/L; Sodium thiosulfate 0,04 g/L; Ammonium iron(III) citrate 0,5 g/L; Bromocresol purple 0,02 g/L; Agar 12,5 g/L şeklindedir. 32 g/L konsantrasyonda olacak şekilde dehidre Lysine Iron Agar besiyeri damıtık suya ilave edilir, kaynar su banyosunda 5–10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak besiyerinin iyice erimesi sağlanır. Besiyeri henüz sıvı halde iken standart 16 X 160 mm tüplere 7'şer mL olarak dağıtılır ve tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve menekşe renkli olup, 25 °C'da pH'sı 6,7±0,2'dir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1–1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılır. Bu şekilde tüpün dibinde 2–2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olmalıdır. Tüpler bu şekilde bekletilir, besiyeri katılaştıktan sonra yüzeye sürme ve aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır. Lysin, LDC pozitif bakteriler (*Salmonella*) tarafından kadeverine çevrilir. Bu reaksiyon pH indikatörünün menekşe renk almasına neden olur. Reaksiyon pH 6'dan daha düşük asit ortamda gerçekleşir. Bu nedenle önce glikoz fermantasyonu sonucu ortam asitlenir. Dolayısı ile bu besiyeri glikozu fermente edebilen bakterilerin LDC enzimi varlığını belirlemek için kullanılabilir. LDC enzimi olmayan bakterilerde besiyeri rengi sarı olarak kalır, ancak inkübasyonun uzaması halinde alkalinizasyon gerçekleşerek sahte pozitif sonuçlar alınabilir. Bu nedenle inkübasyon süresi 24 saati geçmemelidir. Birkaç *Proteus morganii* suşu hariç olmak üzere *Proteus* ve *Providencia* ise lisini α-ketocarboxylic asit oluşacak şekilde deamine eder. Bu bileşik ise yüzeyin hemen altında oksijen etkisi ile demirle reaksiyona girerek kırmızımsı kahverengi bir bileşik oluşturur. Hidrojen sülfür oluşumu dipte siyah renk ile belirlenir. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 7 mL olmak üzere 2232 tüp hazırlanabilir.

50. *Listeria monocytogenes* Analiz Malzemesi

50.01. Fraser <i>Listeria</i> Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398)	293
50.02. Fraser <i>Listeria</i> Supplement (Merck 1.10399)	294
50.03. PALCAM Agar (Merck 1.11755)	294
50.04. PALCAM Agar Selective Supplement (Merck 1.12122)	295
50.05. Oxford <i>Listeria</i> Selective Agar (Merck 1.07004)	295
50.06. Oxford <i>Listeria</i> Selective Supplement (Merck 1.07006)	296
50.07. Tryptone Soya Yeast Extract (TSYE) Agar	296
50.08. Buffered <i>Listeria</i> Enrichment Broth acc. to FDA (Merck 1.09628)	296
50.09. <i>Listeria</i> Selective Enr. Supp.; FDA/BAM 1995, IDF/FIL (Merck 1.11781)	297
50.10. <i>Listeria</i> Enrichment Broth (LEB) acc. to FDA/IDF (Merck 1.11951)	297
50.11. Singlepath <i>Listeria</i> (Merck 1.04142)	298

50.01. Fraser *Listeria* Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398)

Bileşimi, Proteose peptone 5,0 g/L; Peptone from Casein 5,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; Meat extract 5,0 g/L; NaCl 20,0 g/L; Na₂HPO₄ 9,6 g/L; KH₂PO₄ 1,35 g/L; Esculin 1,0 g/L; Lithium chloride 3,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri damıtık su içinde 55,0 g/L olacak şekilde ve gerekirse ısıtılarak çözülür ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri sarımsı kahverenginde, hemen hemen berrak ve 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Fraser Broth besiyeri inhibitörsüz, yarım kuvvette (1/2) inhibitör ilave edilmiş ve tam kuvvette inhibitör ilave edilmiş olmak üzere üç şekilde kullanılır. İnhibitör ilave edilmeden besiyeri oda sıcaklığında 2 ay saklanabilmekle beraber, inhibitör ilave edildiğinde aynı gün kullanılmalıdır. İnhibitörsüz Fraser Broth *L. monocytogenes* sayımında seyrelti hazırlanması ve canlandırma işlemi için kullanılır. Başlangıçta tüplere 9'ar mL dağıtıldıktan sonra sterilize edilmesi gerekir. Yarım kuvvette inhibitör ilave edilerek hazırlanmış Fraser Broth besiyeri ISO yöntemi ile *L. monocytogenes* aranmasında ön zenginleştirme için kullanılır. Selektif besiyerinin hazırlanması için steril 1 litre Fraser Broth besiyerine oda sıcaklığında her ikisi de 1'er mL steril damıtık su içinde çözülmek üzere 1 şişe amonyum sitrat katkısı ve 1 şişe selektif katkı ilave edilir. İyiçe karıştırılıp steril erlenlere aseptik koşullar altında 225'er mL dağıtılır. Tam kuvvette inhibitör ilave edilmiş Fraser Broth besiyeri ISO yöntemi ile *L. monocytogenes* aranmasında selektif zenginleştirme için kullanılır. Bu selektif besiyerinin hazırlanmasında sterilize edilmiş 1 litre Fraser Broth besiyerine oda sıcaklığında 1'er mL steril damıtık su içinde çözülmüş 1 şişe amonyum sitrat katkısı ve 2 şişe selektif katkı ilave edilir. İyiçe karıştırılıp steril tüplere aseptik koşullar altında 10'ar mL dağıtılır. Fraser Broth besiyerinde *Listeria* türlerinin optimum gelişme koşulları yüksek besin maddesi içeriği ve tamponlama kapasitesi ile sağlanmıştır. Refakatçi floranın gelişimi önemli ölçüde lityum klorür, nalidiksik asit ve akriflavin hidroklorür ile baskılanır. *Listeria* 'nın β-D-glucosidase aktivitesi

eskulin ve amonyum demir (III) sitrat ile belirlenir. Eskulin β -D-glucosidase enzimi ile eskuletin ve glikoza parçalanır. Eskuletin demir (III) sitrat ile zeytin yeşili-siyah renk veren kompleks yapar. Dolayısıyla besiyeri renginin kararması *Listeria* türlerinin varlığını gösterir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 8,7 litre besiyeri hazırlanabilir. Bazal besiyerini yarım ya da tam kuvvette selektif hale getirmek için Fraser *Listeria* Supplement (Merck 1.10399) kullanılmalıdır. 1 pakette 8 şişe amonyum demir (III) sitrat ve 8 şişe selektif katkı bulunur. Selektif katkı, 500 g olan 1 kutu dehidre bazal besiyerinden yarım kuvvette selektif Fraser Broth besiyeri hazırlamak için yeterlidir.

50.02. Fraser *Listeria* Supplement (Merck 1.10399)

Fraser Broth (Merck 1.10398)'un yarım ve tam kuvvette selektif hale getirilmesi için kullanılır. 1 pakette 8 şişe amonyum demir (III) sitrat (500 mg/şişe) ve 8 şişe selektif katkı (akriflavin 12,5 mg/şişe ve nalidiksik asit 10 mg/şişe) vardır. 1000 mL Fraser Broth hazırlamada yarım kuvvette selektivite için 1 şişe amonyum demir (3) sitrat ve 1 şişe selektif katkı kullanılırken, tam kuvvette ilave 1 şişe daha selektif katkı kullanılır. Her iki şişe içeriği 1 mL steril damıtık su ilavesi ile çözülür. Katkılar sterilize edilip oda sıcaklığına soğumuş Fraser Broth besiyerine ilave edilir. Katkının en ekonomik şekilde kullanılması için 4 analiz beraber yapılır. 225 mL olarak hazırlanacak 4 adet Fraser Broth besiyerinin her birine mikro pipet kullanılarak 0,225'er mL olacak şekilde her 2 katkıdan da ilave edilir. Bu şekilde 4 adet 225 mL yarım kuvvette besiyeri hazırlanmış olur. Katkı şişelerinde 0,1'er mL çözelti kalmıştır. Her biri 10'ar mL olarak hazırlanan 4 adet Fraser Broth tüpünü tam kuvvette selektif yapmak için üzerlerine amonyum demir (3) sitrat çözeltisinden 0,01'er mL ve selektif katkıdan 0,02'şer mL ilave edilir. **Not 2:** Fraser Broth katkılarının en ekonomik kullanımı için 4 gıda paralel olarak analiz edilir. Bu amaçla 4 adet 225 mL ile 1 adet 40 mL Fraser Broth hazırlanır. Her iki selektif katkı mikropipet kullanılarak ayrı ayrı 1'er mL steril damıtık su ile çözülür. Amonyum demir (III) sitrat katkısı 4 adet 225 mL erlene 0,225'er mL, 40 mL erlene 0,04 mL olacak şekilde ilave edilir. Antibiyotik katkısı ise yarım ve tam konsantrasyonda eklenir. Buna göre, 4 adet 225 mL Fraser Broth içeren erlene 0,225'er mL ancak 40 mL'ye 0,08 mL ilave edilir. 40 mL'lik besiyeri 4 adet steril tüpe 10'ar mL olarak dağıtılır.

50.03. PALCAM Agar (Merck 1.11755)

Bileşimi, ISO formülüne göre Peptone 23,0 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; Nişasta 1,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Agar 13,0 g/L (= Columbia Agar); D(-)mannitol 10,0 g/L; ammonium iron(III) citrate 0,5 g/L; Esculin 0,8 g/L; Glucose 0,5 g/L; Lithium

chloride 15,0 g/L; Phenol red 0,08 g/L şeklindedir. Bu besiyeri ISO ve IDF yöntemleri ile *L. monocytogenes* aranmasında ve *L. monocytogenes* sayılmasında kullanılır. 500 mL damıtık su içinde 35,9 g bazal besiyeri gerekirse ısıtılarak çözülür ve otoklavda manyetik taş ile birlikte 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışı 45 °C'a soğutulup üzerine 1 mL steril damıtık su içinde çözülmüş 1 şişe selektif katkı (PALCAM Listeria Selective Supplement; Merck 1.12122) ilave edilir. Manyetik karıştırıcı ile selektif katkı homojen bir şekilde dağıtılıp steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Buzdolabında 2 haftaya kadar depolanabilir. Besiyeri bileşimindeki antibiyotikler ve lityum klorür ile refakatçi flora olarak bulunan Gram negatiflerin ve çoğu Gram pozitiflerin inhibisyonu sağlanır. *Listeria* 'nın β -D-glucosidase aktivitesi eskulin ve amonyum demir (III) sitrat ile belirlenir. Eskulin β -D-glucosidase enzimi ile eskuletin ve glikoza parçalanır. Eskuletin demir (III) sitrat ile zeytin yeşili-siyah renk veren kompleks yapar. Stafilokok ve enterokok gibi mannitol pozitif bakteriler eğer inhibe olmamışlar ise sarı renkli ve sarı zonlu koloni oluştururlar. *L. monocytogenes* bu besiyerinde 1,5–2 mm çapında zeytin yeşili-gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu koloni oluşturur (bakınız; Ek B 25). 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 7,2 litre (14 adet 500 mL) besiyeri, dolayısıyla 560 Petri kutusu hazırlanır. Selektif katkı (PALCAM Listeria Selective Supplement; Merck 1.12122) 16 şişelik paket halindedir.

50.04. PALCAM Agar Selective Supplement (Merck 1.12122)

Her şişe içeriği, Polymixin B Sulfate 5,0 mg; ceftacidim 10,0 mg ve acriflavine 2,5 mg şeklindedir. 1 mL steril damıtık su ile çözülerek sterilize edilmiş ve 45 °C'a soğutulmuş 500 mL PALCAM Agar besiyerine ilave edilir. 1 pakette 16 şişe vardır.

50.05. Oxford Listeria Selective Agar (Merck 1.07004)

Bileşimi, Peptone 23,0 g/L; Starch 1,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Agar 13,0 g/L (= Columbia agar); Esculin 1,0 g/L; Ammonium iron(III) citrate 0,5 g/L; Lithium chloride 15,0 g/L şeklindedir. Bu besiyeri ISO, FDA ve IDF yöntemleri ile *L. monocytogenes* aranmasında ve *L. monocytogenes* sayılmasında kullanılır. 500 mL damıtık su içinde 29,25 g bazal besiyeri gerekirse ısıtılarak çözülür ve otoklavda manyetik taş ile birlikte 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışı 45 °C'a soğutulup üzerine 5 mL, 1 : 1 oranında hazırlanmış steril damıtık su : alkol karışımı içinde çözülmüş 1 şişe selektif katkı (Oxford Listeria Selective Supplement Merck 1.07006) ilave edilir. Manyetik karıştırıcı ile selektif katkı homojen bir şekilde dağıtılır ve yaklaşık 12,5 mL/Petri olacak şekilde 40 Petri kutusuna dağıtılır.

Hazırlanmış besiyeri berrak ve mavimsi kahve renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Buzdolabında 2 haftaya kadar depolanabilir. Besiyeri bileşimindeki antibiyotikler ve lityum klorür ile refakatçi flora olarak bulunan Gram negatiflerin ve çoğu Gram pozitiflerin inhibisyonu sağlanır. *Listeria* eskulini β-D-glucosidase enzimi ile eskuletin ve glikoza parçalanır. *L. monocytogenes* bu besiyerinde 2–3 mm çapında siyahımsı yeşil kahverengi siyah zonlu çökük merkezli koloni oluşturur (bakınız; Ek B 26). 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 8,5 litre besiyeri (680 Petri kutusu) hazırlanabilir. Selektif katkı (Oxford Listeria Selective Supplement; Merck 1.07006) 13 şişelik paket olarak sağlanmaktadır.

50.06. Oxford Listeria Selective Supplement (Merck 1.07006)

Oxford Listeria Selective Agar (Merck 1.07004) için selektif katkıdır. Bileşimi her şişede, cycloheximide 200,0 mg; colistin sulfate 10,0 mg; acriflavin 2,5 mg; cefotetan 1,0 mg ve fosfomycin 5,0 mg şeklindedir. Şişe içeriği 2,5 mL steril damıtık su ve 2,5 mL etil alkol (Merck 1.00983) karışımında çözülür ve otoklavda sterilize edilip 45 °C'a soğutulmuş 500 mL Oxford Listeria Selective Agar besiyerine ilave edilir. 1 kutuda 13 şişe vardır.

50.07. Tryptone Soya Yeast Extract (TSYE) Agar

IDF, ISO ve FDA yöntemleri ile *L. monocytogenes* aranmasında selektif katı besiyerinden alınan kolonilerin ilk doğrulaması için kullanılır. 30 g/L CASO Broth (Merck 1.05459), 6 g/L maya ekstraktı (Yeast Extract; Merck 1.03753) ve 15 g/L agar (Merck 1.01613) olacak şekilde 3 besiyeri ve katkının karışımı ile hazırlanır. Bileşenler damıtık su içinde ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilip steril Petri kutularına 12,5'er mL olacak şekilde dökülür. *Listeria* kolonileri bu besiyerinde 35 °C ya da 37 °C'da 18 ya da 24 saat inkübasyon sonunda 1–2 mm çapında konveks, renksiz ya da opak düzgün kenarlı koloniler oluşturur.

50.08. Buffered Listeria Enrichment Broth acc. to FDA (Merck 1.09628)

Bu besiyeri "Listeria Enrichment Broth Base acc. to FDA/BAM" adı ile de bilinir. Bileşimi, Tryptic Soy (CASO) Broth 30,0 g/L; Yeast extract 6,0 g/L; Na₂HPO₄ 9,6 g/L; KH₂PO₄ 1,35 g/L; Sodium pyruvate 1,1 g/L şeklindedir. 500 mL damıtık su içinde 24 g dehidre besiyeri gerekirse ısıtılarak çözülür, 500 mL'lik erlenlere 225'er mL dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış bazal

besiyeri berrak ve 25 °C'da pH'sı $7,3\pm0,2$ 'dir. İnhibitör ilave edilmeden besiyeri oda sıcaklığında 2 ay saklanabilmekle beraber, inhibitör ilave edildiğinde aynı gün kullanılmalıdır. Sterilize edilip oda sıcaklığına soğutulmuş bazal besiyerine 1 mL steril damıtık su ile çözülmüş *Listeria Selective Enrichment Supplement* acc. to FDA/BAM 1995 and IDF/FIL'den (Merck 1.11781) 0,5 mL ilave edilir. Besiyeri CASO Broth besiyerinin modifikasyonudur. 6 g/L konsantrasyonda maya ekstraktı ilave edilmiş, ve tamponlama kapasitesi artırılmıştır. Glikoz temel karbohidrat kaynağı olarak bileşimde bulunur. Sodyum klorür besiyerinin ozmotik dengesini sağlarken, fosfat tamponlama görevi yapar. Sodyum piruvat ise hasar görmüş *Listeria* türlerine destek olur. Selektif katkıdaki acriflavin, cycloheximide ve nalidixic asit refakatçi floranın gelişimini baskılar. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 225 mL olmak üzere 47 adet besiyeri hazırlanır.

50.09. *Listeria Selective Enrichment Supplement* acc. to FDA/BAM 1995 and IDF/FIL (Merck 1.11781)

Bu katkı hem Buffered *Listeria Enrichment Broth* acc. to FDA (Merck 1.09628) hem de *Listeria Enrichment Broth* acc. to FDA/IDF (Merck 1.11951) için kullanılmaktadır. Bileşimi, acriflavin HCl 5,0 mg; cycloheximide 25,0 mg ve nalidixic asit (sodyum tuzu) 20,0 mg şeklindedir. 1 mL steril damıtık su ile çözülür. Buffered *Listeria Enrichment Broth* acc. to FDA (Merck 1.09628) besiyerine 225 mL'ye 0,5 mL; *Listeria Enrichment Broth* acc. to FDA/IDF (Merck 1.11951) besiyerine ise 225 mL'ye 0,45 mL olarak ilave edilir. 1 kutuda 16 şişe vardır.

50.10. *Listeria Enrichment Broth (LEB)* acc. to FDA/IDF (Merck 1.11951)

Bu besiyeri "*Listeria Enrichment Broth Base* acc. to FDA/IDF-FIL" adı ile de bilinir. Bununla beraber, FDA formülasyonu değiştiği için (Buffered *Listeria Enrichment Broth*; Merck 1.09628) bu besiyeri artık sadece IDF yöntemi olarak kalmıştır. Bileşimi, Peptone from Casein 17 g/L; Peptone from soymeal 3,0 g/L; D(+) glucose 2,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; KH_2PO_4 2,5 g/L (CASO Broth); Yeast extract 6, 0 g/L şeklindedir. 500 mL damıtık su içinde 18 g dehidre besiyeri gerekirse ısıtılarak çözülür ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış bazal besiyeri berrak ve kahverengidir, 25 °C'da pH'sı $7,3\pm0,2$ 'dir. İnhibitör ilave edilmeden besiyeri oda sıcaklığında 2 ay saklanabilmekle beraber, inhibitör ilave edildiğinde aynı gün kullanılmalıdır. Bu besiyeri IDF yöntemine göre *L. monocytogenes* aranmasında kullanılacak ise steril bazal besiyerine, 1 mL steril damıtık su ilavesi ile hazırlanan 1 şişe selektif katkı (*Listeria Selective Enrichment Supplement* acc. to FDA/BAM and IDF/FIL; Merck 1.11781) ilave edilip iyice

kariştırılır ve steril erlenlere 225 mL olacak şekilde aseptik koşullar altında dağıtılır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 27 adet 500 mL (13,8 litre) bazal besiyeri hazırlanabilir.

50.11. Singlepath Listeria (Merck 1.04142)

İmmuno-kromatografik bir test kiti olup, yarı selektif Fraser Broth besiyerinde ön zenginleştirme, selektif Buffered Listeria Enrichment Broth besiyerinde zenginleştirme aşamalarından sonra Singlepath Listeria kiti kullanılarak örnekte *Listeria* olup olmadığı kontrol edilir. Katı gıda blender ya da stomacherde homojenize edilecek ise doğrudan 225 mL Fraser Broth besiyeri içinde homojenize edilir. Gıdadaki *Listeria* 'nın hasar görmüş olmasından endişe ediliyorsa Fraser Broth besiyeri önce 30 °C'da 4 saat inkübe edilir, selektif katkı bu inkübasyondan sonra besiyerine eklenir. Toplam 24 saat süre 30 °C'da yapılan inkübasyondan sonra 0,1 mL ön zenginleştirme kültürü tercihen 10 mL katkısı ilave edilmiş Buffered Listeria Enrichment Broth (LEB) acc. to FDA (Merck 1.09628) besiyerine ya da başka bir Listeria selektif zenginleştirme besiyerine aktarılıp, 30 °C'da 24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda bu kültürden cam bir tüpe 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL Singlepath Listeria kitine uygulanır. 20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görölmesi analiz edilen kültürde *Listeria* olduğunu gösterir (bakınız; Ek A 13). Pozitif sonuē alındığında doğrulama için standart bir katı besiyerine sürme yapılıp sonucun doğrulanması önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuē alınırsa analize devam etmenin gereği yoktur. 1 pakette 25 test kiti vardır.

51. *Clostridium perfringens* Analiz Malzemesi

51.01. Tryptose Sulfite Cyclocerine (TSC) Agar (Merck 1.11972)	298
51.02. TSC Agar Katkısı (Merck 1.00888)	299
51.03. Gliserin–Tuz Çözeltisi	299
51.04. Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM) (Merck 1.11699)	300
51.05. Sulfite Iron Agar Base (Merck 1.10864)	300

51.01. Tryptose Sulfite Cyclocerine (TSC) Agar (Merck 1.11972)

Bileşimi, Tryptose 15,0 g/L; Peptone from soymeal 5,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; Sodium disulfite 1,0 g/L; Ammonium iron(III) citrate 1,0 g/L ve Agar 15,0 g/L'dir. Dehidre besiyeri 42 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir ve

manyetik taş ile birlikte otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sülfite indirgeyen *Clostridium* 'ların sayımı için yumurta sarısı ilavesi gerektiğinde 80 mL/L konsantrasyonda olacak şekilde steril yumurta sarısı emülsiyonu (Merck 1.03784) 50 °C'a kadar soğutulup su banyosunda tutulan bazal besiyerine ilave edilip manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Bu besiyeri amaca göre yumurta sarısı ilave edilmeden de kullanılmaktadır. *Cl. perfringens* sayımı için bazal besiyeri 50 °C'a soğutulduktan sonra filtre ile sterilize edilmiş %5 konsantrasyondaki D-Cycloserine çözeltisinden 10 mL/L olacak şekilde ilave edilip manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve yine 12,5 mL/Petri olacak şekilde steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık kahve renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,6±0,2'dir. Sikloserin ilave edilmiş besiyeri 4 gün içinde kullanılmalıdır. Bu yöntem uygulandığında inkübasyon anaerobik koşullarda ve 44 °C'da 18–22 saat süre ile yapılır. TSC Agar bileşimindeki besin maddeleri *Cl. perfringens* gelişimini sağlarken hidrojen sülfür oluşumu kolonilerin siyahlaşması ile belirlenir (bakınız; Ek B 27). Sikloserin refakatçi flora gelişimini baskılar. 500 g olan 1 kutu TSC Agar dehidre besiyeri ile ve 12,5 mL/ Petri olacak şekilde; TSC Agar + yumurta sarısı emülsiyonu için 961 Petri kutusu ve TSC + D-Cycloserine için 952 Petri kutusu hazırlanabilir. TSC Agar besiyeri özel bir katkı ile de kullanılabilir. TSC Agar katkısı olarak adlandırılan ve Florojenik MUP ve D-Cycloserine karışımı olan bu katkı kullanıldığında ayrıca D-Cycloserine ilavesine gerek yoktur.

51.02 TSC Agar Katkısı (Merck 1.00888)

Bu katkı *Clostridium perfringens* katkısı ya da MUP olarak da bilinir. Şişeye 5 mL steril damıtık su ilave edilir ve otoklavda sterilize edilip 50 °C'a soğutulmuş 500 mL TSC Agar besiyerine ilave edilir. Bileşimi 200 mg D-Cycloserine; 50 mg 4-methylumbelliferyl-phosphate disodium tuzu olduğu için, bu katkı kullanıldığında ayrıca D-Cycloserine kullanılmasına gerek yoktur. D-Cycloserine refakatçi florayı baskılayıp kolonilerin daha küçük kalmasını sağlarken, aynı zamanda *Clostridium perfringens* kolonilerinin etrafında siyahlaşmaya neden olur. 4-Methylumbelliferyl phosphate (MUP) alkali ve asit fosfataz için florojenik bir bileşiktir. Asit fosfataz *Cl. perfringens* için yüksek düzeyde spesifik olup, MUP'u uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışığa veren 4-methylumbelliferone'a parçalar ve böylece *Cl. perfringens* kolaylıkla belirlenir (bakınız; Ek B 28). Katkı ilave edilmiş besiyeri berrak ve açık kahverengidir. Bir kutuda 16 şişe vardır.

51.03. Gliserin–Tuz Çözeltisi

Hazır ticari preparatı yoktur. Gliserin (Merck 1.04093) 100 mL; K₂HPO₄ (Merck 1.05109) 12,4 g; KH₂PO₄ (Merck 1.04873) 4 g; NaCl (Merck 1.06404) 4,2 g;

damıtık su 900 mL bileşimindedir. Bileşenler gerekirse ısıtarak damıtık su içinde çözüldükten sonra amaca uygun kaplara dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir.

51.04. Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM) (Merck 1.11699)

Bileşimi, Peptone from Casein 5,0 g/L; Peptone from meat 5,0 g/L; Meat extract 8,0 g/L; Yeast extract 1,0 g/L; Starch 1,0 g/L; D(+) glucose 1,0 g/L; L-cysteinium chloride 0,5 g/L; Sodium acetate 5,0 g/L; Sodium di-sulfite 0,5 g/L; Ammonium iron(II) citrate 0,5 g/L; Sodium resazurin 0,002 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 27,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak çözülür ve tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Bu besiyeri Reinforced Clostridial Medium'un geliştirilmiş şeklidir. Redoks indikatörü olan resazurin anaerobik atmosferin sağlandığını göstermek için kullanılır. *Clostridium* 'lar sülfiti sülfüre indirgerler ve demir sülfür oluşumuna bağlı olarak besiyeri siyahlaşır. Aynı indirgemeyi sağlayabilen diğer bakterilerden sporsuz olanlar ekimden önceki pastörizasyon ile, sporlu aeroblar ise anaerob inkübasyon ile baskılanır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık kahve-kırmızımsı renkte olup 25 °C'da pH'sı 7,1±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri 2 hafta depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1818 tüp hazırlanabilir.

51.05. Sulfite Iron Agar Base (Merck 1.10864)

Bileşimi, Peptone from Casein 15,0 g/L; Yeast extract 10,0 g/L; Sodium sulfite 0,5 g/L; Agar 15,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 40,5 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışı yaklaşık 45 °C'a soğuduğunda yine otoklavda sterilize edilmiş %7 demir (2) sülfat (Merck 1.03965) çözeltisinden 20 mL/L olacak şekilde eklenir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı, sarımsı yeşildir ve 25 °C'da pH'sı 6,9±0,2'dir. Materyalin pastörizasyonundan sonra kalan sporlar germine olur ve bunlardan hidrojen sülfür pozitif olanlar sülfiti sülfüre indirgerler ve oluşan demir sülfür siyah koloniler oluşmasını sağlar. Hidrojen sülfür zayıf pozitif bakteriler ise kahverengi koloni oluştururlar. *Clostridium* 'lar anaerobik inkübasyon koşullarında siyah koloni yaparlar. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri kutusu hesabı ile 20 g/L konsantrasyonda demir (2) sülfat çözeltisi ilave edilmiş olmak üzere 1007 adet Petri kutusu hazırlanabilir.

52. Enterokok Analiz Malzemesi

52.01. Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294)	301
52.02. ReadyCult Enterococci (Merck 1.01299)	301
52.03. Membran-Filter Enterococcus Sel. Agar; Slanetz, Bartley (Merck 1.05262)	301

52.01. Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294)

Bileşimi, Peptones 8,6 g/L; NaCl 6,4 g/L; Sodium azide 0,6 g/L; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (X-GLU) 0,04 g/L; Tween 80 2,2 mL/L şeklindedir. Tek kuvvet için 18,0 g/L, çift kuvvet için 36,0 g/L olacak şekilde dehidre besiyeri damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak çözülür ve tek kuvvette hazırlananlar standart deney tüplerine, çift kuvvette olanlar ise 18X180 mm büyük tüplere 10'ar mL veya 250 mL'lik erlenlere 100'er mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renkli olup, 25 °C'da pH'sı 7,5±0,2'dir. Besiyeri bileşiminde bulunan sodyum azid özellikle Gram negatiflerin gelişmesini baskılar. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (X-GLU)'in parçalanması özel peptonlar ile desteklenir. X-GLU'nun parçalanması sonunda oluşan mavi-yeşil renk oluşumu (bakınız; Ek B 29) enterokoklar ve D grup streptokoklar için karakteristiktir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile tek kuvvette 27,8 litre, çift kuvvette 13,9 litre besiyeri hazırlanabilir. Bu besiyerinin 100 g olan ambalajı da vardır.

52.02. ReadyCult Enterococci (Merck 1.01299)

Su analizleri için hazırlanmış ve ışınlanarak sterilize edilmiş dehidre formdaki Chromocult Enterococci Broth besiyeridir. Analiz edilecek 100 mL suya ilave edilip karıştırılır ve doğrudan inkübasyona bırakılır. ReadyCult Enterococci su analizinde enterokokların varlığını/yokluğunu gösteren test için kullanılmaktadır. Bu nedenle analizin yapılacağı kabın önceden sterilize edilmiş olması gereklidir. Aynı şekilde besiyeri su örneğine ilave edilirken gerekli hijyenik kurallara uyulmalıdır. Bu besiyeri 20 analizlik paketler halindedir.

52.03. Membran-Filter Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley (Merck 1.05262)

Bileşimi, Tryptose 20 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; D(+)-glucose 2,0 g/L; K₂HPO₄ 4,0 g/L; sodyum azid 0,4 g/L; 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0,1 g/L; agar 10,0 g/L şeklindedir. Slanetz-Bartley Agar olarak da bilinen bu besiyeri 41,5 g/L olacak

şekilde damıtık su içinde 20 dakika kaynatılarak sterilize edilir. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Hızla soğutulup steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı-kahve olup, 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki sodyum azid refakatçi Gram negatif florayı inhibe eder. Enterokoklar TTC'yi indirgeyerek kırmızı renkli formazona dönüştürürler. Dolayısıyla enterokok koloniler bu besiyerinde kırmızı renkleri ile tanımlanır (bakınız; Ek B 30). 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL olacak şekilde 963 Petri kutusu hazırlanabilir.

53. *Bacillus cereus* Analiz Malzemesi

53.01. Cereus Selective Agar acc. to Mossel (Merck 1.05267)	302
53.02. <i>Bacillus cereus</i> Selective Supplement (Merck 1.09875)	303
53.03. Egg-yolk Emulsion (Merck 1.03784)	303
53.04. CASO Broth + Polymxin B Sulfate	304

53.01. Cereus Selective Agar acc. to Mossel (Merck 1.05267)

Bu besiyeri Mannitol Egg-yolk Polymyxin (MYP) adları ile de bilinir. Bileşimi, pepton from casein 10,0 g/L; et ekstraktı 1,0 g/L; D(-) mannitol 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L phenol red 0,025 g/L ve agar 12,0 g/L şeklindedir. *B. cereus* sayılmasında kullanılan bu besiyerinin hazırlanması diğer pek çok besiyeri hazırlanmasına göre katkıların ilavesi açısından farklılık gösterir. Bu besiyeri hazırlandıktan sonra ancak 3–4 gün depolanabilir. Bu nedenle 1 litre değil genellikle 500 mL olarak (40 Petri) hazırlanır. Cereus Selektif Agar katkısı (Merck 1.09875) 500 mL besiyeri için 1 şişe olarak hazırlanmıştır. Ancak steril yumurta sarısı emülsiyonu (Merck 1.03784) 100 mL şişe içinde olup bu miktar 1 litre besiyeri için kullanılır. Bu durumda 450 mL olarak hazırlanan bazal besiyerine 100 mL'lik steril yumurta sarısı emülsiyonundan aseptik koşullar altında 50 mL'sinin alınıp bazal besiyerine ilave edilmesi gerekir. Her ne kadar yumurta sarısı emülsiyonu laboratuvar koşullarında taze yumurtadan hazırlanabilirse de genel kurallar çerçevesinde hazır ticari preparat kullanımı önerilir. Burada 50 mL steril yumurta sarısı emülsiyonunun bazal besiyerine ilavesinde aseptik koşullara uyulmasından başka bir sorun yoktur. Eğer kullanım miktarına bağlı olarak 1 litre besiyeri hazırlanması uygun ise kuşkusuz aşağıda verilen hazırlama şekli 43 g/L bazal dehidre besiyeri, otoklav sonrası 100 mL steril yumurta sarısı emülsiyonu ve 2 şişe selektif katkı şeklinde olmalıdır. Besiyerinin hazırlanması için 450 mL damıtık su içinde 21,5 g dehidre besiyeri ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Su banyosunda 45–50 °C'a soğutulup üzerine 50 mL steril yumurta sarısı emülsiyonu ile 1 şişe *B. cereus* selektif katkısı ilave edilir ve karıştırılarak standart

Petri kutularına 12,5'er mL ve/veya 14 cm çaplı büyük Petri kutularına 50'şer mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri yumurta sarısı nedeni ile bulanık ve hafif portakal renklidir. 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Besiyeri selektif katkısında bulunan polimiksin (Merck 1.09875) refakatçi florayı baskılarken bu konsantrasyon *B. cereus* üzerinde olumsuz etki yapmaz. Eğer analiz edilecek gıdada refakatçi flora varlığı beklenmiyor ise veya bu floranın az sayıda olduğu tahmin ediliyor ise polimiksin kullanılması zorunlu değildir. *B. cereus* mannitol negatif olduğu için refakatçi flora içindeki mannitol pozitif olanlardan rahatlıkla ayrılır. *B. cereus* mannitolü kullanmadığı için kırmızı koloni oluştururken mannitol pozitif olanların koloni rengi sarı/pembedir (bakınız; Ek B 31). Besiyeri bileşimindeki yumurta sarısı ise *B. cereus* 'un lesitinaz aktivitesi ile belirlenmesini sağlar. *B. cereus* lesitinaz pozitif olduğu için kolonileri etrafında beyaz bir presipitasyon meydana gelir. Çoğu *B. cereus* suşunda bu reaksiyon 18 saat gibi kısa bir süre içinde belirgin olarak izlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile katkılar ilave edilmiş olmak üzere standart boyda 930 veya 14 cm çaplı büyük boyda 232 Petri kutusu hazırlanabilir. 1 kutu 500 g dehidre besiyeri için 12 şişe 100 mL steril yumurta sarısı emülsiyonu ve 23 adet 16 şişelik selektif katkı gerekir.

53.02. *Bacillus cereus* Selective Supplement (Merck 1.09875)

Polymyxin supplement adı ile de bilinir. Başta *Cereus* Selective Agar (Merck 1.05267) olmak üzere pek çok besiyerinde katkı olarak kullanılır. 1 şişe içinde 50.000 IU polymyxin B Sulfate vardır. Steril 1 mL damıtık su ile çözülüp otoklavda sterilize edilmiş ve 45 °C'a soğutulmuş 450 mL *Cereus* Selective Agar bazal besiyerine 50 mL yumurta sarısı emülsiyonu (Merck 1.03784) ile birlikte katılır. Yine *Bacillus cereus* analizinde zenginleştirme amacıyla kullanılan CASO Broth (Merck 1.05459) besiyerine ilave edilebileceği gibi başka besiyerlerinde de farklı konsantrasyonlarda kullanılabilir. Ayrıca Duopath sisteminde Verotoksin belirlenmesi için de bu katkı kullanılmaktadır.

53.03. Egg–yolk Emulsion (Merck 1.03784)

Bacillus cereus analizinde kullanılan *Cereus* Selective Agar (Merck 1.05267) ile *Staphylococcus* analizinde kullanılan Potassium Thiocyanate Actidione Sodium Azid Egg–yolk Pyruvate (Kranep) Agar (Merck 1.05395) besiyerleri için katkıdır. 500 mL steril yumurta sarısı ve 4,25 g NaCl'ün steril damıtık su ile 1 litreye tamamlanması ile hazırlanır. 100 mL ambalaj her iki besiyeri için de 900 mL bazal besiyerine ilave edilir.

53.04. CASO Broth + Polymyxin B Sulfate

EMS yöntemi ile *Bacillus cereus* sayılmasında kullanılan besiyeridir. CASO Broth (Merck 1.05459) tek kuvvette 30 g/L, çift kuvvette 60 g/L konsantrasyonda olacak şekilde gerekirse ısıtılarak damıtık su içinde eritilir, tüplere 10'ar mL ya da amaca uygun şekilde erlenlere dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Bileşimi, 50.000 IU polymyxin B Sulfate olan *Bacillus cereus* Selective Supplement (Merck 1.09875) 5 mL steril damıtık su ile çözülür. Bu çözelti tek kuvvette hazırlanmış CASO Broth besiyerine 0,1 mL/L ve çift kuvvette hazırlanmış olana 0,2 mL/L olacak şekilde ilave edilir.

54. *Yersinia enterocolitica* Analiz Malzemesi

54.01. <i>Yersinia</i> Selective (CIN) Agar Base (Merck 1.16434)	304
54.02. CIN Agar Supplement (Merck 1.16466)	305
54.03. SSDC Agar (Merck 1.16724)	305

54.01. *Yersinia* Selective (CIN) Agar Base (Merck 1.16434)

"*Yersinia* Selective Agar Base acc. to Schiemann" adı ile de bilinir. Bileşimi, Peptone from Casein 10,0 g/L; Peptone from meat 10,0 g/L; Yeast extract 2,0 g/L; D (-) mannitol 20,0 g/L; Sodium pyruvate 2,0 g/L; NaCl 1,0 g/L; MgSO₄ 0,01 g/L; Bile salt mixture 1,0 g/L; Neutral red 0,03 g/L; Crystal violet 0,001 g/L; Agar 12,5 g/L şeklindedir. 500 mL damıtık su içinde 29,25 g dehidre besiyeri gerekirse ısıtılarak eritilip manyetik taş ile birlikte otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. 50 °C'a soğutulup üzerine 1 mL steril damıtık su ve 1 mL etil alkol karışımı ile çözülmüş 1 şişe *Yersinia* Selective Supplement (Merck 1.16466) ilave edilir. Manyetik karıştırıcıda iyice karıştırılıp, steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızıdır, 25 °C'da pH'sı 7,4±0,2'dir. *Yersinia* kolonileri serotipe bağlı olarak farklı büyüklüklerde gelişirler. Koloniler koyu kırmızı merkezlidir ve çevresinde saydam bir zon oluşur (bakınız; Ek B 32 ve B 33). Bazı Enterobacteriaceae üyeleri ile *Pseudomonas* türleri zayıf şekilde gelişebilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 17 adet 500 mL besiyeri ve dolayısı ile 680 Petri hazırlanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri için 18 adet *Yersinia* Selective Supplement (Merck 1.16466) gerekir. Bu katkı 16 şişelik paket olarak pazarlanmaktadır.

54.02. CIN Agar Supplement (Merck 1.16466)

Yersinia analizinde kullanılan CIN Agar (Merck 1.16434) katkısıdır. Şişe içeriği, cefsulodin 7,5 mg; ırgasan 2,5 mg ve novobiocin 1,25 mg şeklinde olup, 1 mL steril damıtık su ile çözünüp otoklavlanmış ve oda sıcaklığına soğutulmuş 500 mL CIN Agar besiyerine ilave edilir. 1 kutuda 16 şişe vardır.

54.03. SSDC Agar (Merck 1.16724)

Yersinia analizinde kullanılan besiyeridir. Bileşimi. Yeast extract 5,0g/L; Peptones 10,0g/L; Lactose 10,0g/L; Bile salt mixture No 3 8,5g/L; Sodium deoxycholate 10,0g/L; CaCl₂ 1,0g/L; Sodium citrate 10,0g/L; Sodium thiosulfate anhydrous 5,42g/L; Ammonium iron (III) citrate 1,0g/L; Brilliant green 0,0003g/L; Neutral red 0,025g/L; Agar 15,0 şeklindedir. "Salmonella–Shigella Agar with Sodium Deoxycholate and Calcium Chloride" adı ile de bilinen bu besiyeri ISO 10273'e göre patojenik *Yersinia* serotiplerinin ve özellikle *Y. enterocolitica* O:3 serotipinin izolasyonu ve tanımlanması için uygundur. Dehidre besiyeri kaynar su banyosunda tümüyle eriyinceye kadar sürekli karıştırılır. Su banyosunda 1 saati geçmeyecek şekilde 50 °C'a soğutulur ve Petri kutularına 20 mL dağıtılır. Besiyerinin aşırı ısıtılmasından kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı kahve renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,4±0,2'dir. Buzdolabında ve karanlıkta olmak kaydı ile 1 gün depolanabilir. Yüzey kurutması sırasında aşırı kuruma olmamasına dikkat edilmelidir. Tek koloni elde edilecek şekilde yüzeye öze ile sürme ya da spatülle yayma yapılır, 30 °C'da 24–48 saat inkübasyon sonunda 1 mm çaplı renksiz yuvarlak koloniler muhtemel *Yersinia* kolonileridir. 10X büyüteç ile bakıldığında merkezde granül yapı gözlenir. Besiyeri bileşimindeki brilliant green, safra tuzları, tiyosülfat ve sitrat çoğu refakatçi floranın gelişimini engeller. Hidrojen sülfür oluşumu tiyosülfat ve demir iyonları ile belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 20 mL olacak şekilde 328 Petri kutusu hazırlanabilir.

55. *Vibrio parahaemolyticus* Analiz Malzemesi

55.01. TCBS Agar (Merck 1.10263)

Vibrio analizinde kullanılan bu besiyeri Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar adı ile de bilinir. Bileşimi, Peptone from Casein 5,0 g/L; Peptone from meat 5,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; Sodium citrate 10,0 g/L; Sodium thiosulfate 10,0 g/L; Ox bile 5,0 g/L; Sodium cholate 3,0 g/L; Sucrose 20,0 g/L; NaCl 10,0 g/L; Iron (III) citrate 1,0 g/L; Thymol blue 0,04 g/L; Bromothymol blue 0,04 g/L; Agar 14,0 g/L

şeklindedir. 88 g/L olacak şekilde damıtık suya ilave edilir ve agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutulur ve soğutulup Petri kutularına dökülür. Isıya duyarlıdır, otoklavlanmaz. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşilimsi mavi renktedir, 25 °C'da pH'sı 8,6±0,2'dir. Bu besiyerinin bileşimi WHO ve APHA talimatlarına uygundur. Yüksek konsantrasyondaki tiyosülfat ve sitrat ile yüksek alkalinite Enterobacteriaceae familyası üyelerinin gelişimini baskılar. Ox bile ve cholate enterokokları inhibe eder. Besiyerinde gelişebilen koliform bakteriler sakkarozu fermente edemez. Sadece birkaç sakkaroz pozitif *Proteus* suşu sarı renkli koloni oluşturabilir. Thymol blue ve bromothymol blue karışık indikatörü sakkarozdan asit oluşumunu sarı renkli koloni oluşumu ile belirtir. 35 °C'da 18–24 saat inkübasyondan sonra düz, 2–3 mm çaplı sarı koloniler *Vibrio cholerae*, *Vibrio cholerae* type El Tor olarak; küçük mavi–yeşil merkezli koloniler *Vibrio parahaemolyticus* olarak; büyük sarı koloniler *Vibrio alginolyticus* olarak; mavi koloniler *Pseudomonas* ve *Aeromonas* olarak izole edilir (bakınız; Ek B 34).

56. *Aeromonas hydrophila* Analiz Malzemesi

56.01. CASO Broth + Ampicillin	306
56.02. GSP Agar (Merck 1.10230)	306
56.03. m-Aeromonas Selective Agar Base (Merck 1.07621)	307
56.04. m-Aeromonas Selective Supplement (Merck 1.07625)	307

56.01. CASO Broth + Ampicillin

CASO (Tryptic Soy) Broth (Merck 1.05459) besiyerine 30 mg/Litre olacak şekilde ampicillin ilavesi ile hazırlanır. Gereken miktar ampicillin steril damıtık suda çözülüp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiş CASO Broth besiyerine ilave edilir.

56.02. GSP Agar (Merck 1.10230)

Pseudomonas ve *Aeromonas* türlerinin analizinde kullanılan bu besiyeri Glutamate Starch Phenol Red olarak da adlandırılır. Bileşimi, Sodium L(+)glutamate 10,0 g/L; starch, soluble 20,0 g/L; KH₂PO₄ 2,0 g/L; MgSO₄ 0,5 g/L; Phenol red 0,36 g/L; Agar 12,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 45 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık suda ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası 50 °C'a soğutulup 100.000 IU/L penicillin G ve gerekir ise 0,01 g/L pimarcin ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir.

Bileşimdeki glutamat ve nişasta yegane besin maddeleri olup, pek çok refakatçi flora bu maddeleri besin olarak kullanamaz. Nişasta *Aeromonas* tarafından asit oluşturularak parçalanır ve bileşimdeki indikatör nedeni ile koloni rengi sarı olur. *Pseudomonas* ise kırmızı renkli koloni oluşturur. Besiyeri selektivitesini artırmak için penisilin G ve eğer gerekli ise antimikotik olan pimarisin ilave edilir. 28 °C'da 3 gün yapılan inkübasyon sonunda oluşan 2–3 mm çaplı sarı renkli ve etrafı sarı zonlu koloniler *Aeromonas*, yine 2–3 mm çaplı kırmızı ve etrafı kırmızı zonlu koloniler *Pseudomonas* olarak değerlendirilir. 500 g dehidre besiyeri ile 12,5 mL olacak şekilde 888 Petri kutusu hazırlanabilir.

56.03. m-Aeromonas Selective Agar Base (Merck 1.07621)

Membran filtrasyon yöntemi ile sulara *Aeromonas* türlerinin analizi için geliştirilmiş olan bu besiyerinin bileşimi, Tryptose 5,0 g/L; Dextrin 11,4 g/L; Yeast extract 2,0 g/L; NaCl 3,0 g/L; KCl 2,0 g/L; MgSO₄ 0,1 g/L; Iron chloride 0,06 g/L; Bromothymolblue 0,08 g/L; Sodium desoxycholate 0,1 g/L; Agar 13,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 18,4 g/ 500 mL damıtık su içinde kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. 50 °C'a soğutulup, 1 mL steril damıtık su içinde çözülmüş 1 şişe m-Aeromonas Selective Supplement (Merck 1.07625) ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve mavi renkli olup, 25 °C'da pH'sı 8,0±0,2'dir. buzdolabında ve karanlıkta olmak kaydı ile 2 haftaya kadar depolanabilir. Selektif katkıdaki ampisilin ve vankomisin Gram pozitif ve Gram negatif pek çok refakatçi bakteriyi inhibe eder. *Aeromonas* türleri dekstrinden asit oluştururlar ve bu asitlik bromothymol blue indikatörü ile koloni renginin sarıya dönüşmesine neden olur (bakınız; Ek B 35). 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL olmak üzere 1086 Petri kutusu hazırlanabilir. 1 kutu dehidre besiyeri için 27 şişe selektif katkıya gerek vardır, selektif katkı 16 şişelik paket olarak pazarlanmaktadır.

56.04. m-Aeromonas Selective Supplement (Merck 1.07625)

m-Aeromonas Selective Agar Base (Merck 1.07621) besiyeri için selektif katkıdır. Her şişede 5,0 mg ampisilin ve 1,0 mg vankomisin vardır. 1 mL steril damıtık su ilave edilerek çözülür. 1 şişe selektif katkı 500 mL bazal besiyeri için kullanılır.

57. *Campylobacter* Analiz Malzemesi

57.01. Bolton Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.00068)	308
57.02. Bolton Broth Selective Supplement (Merck 1.00069)	308
57.03. <i>Campylobacter</i> Selective Agar (Merck 1.02248)	309
57.04. <i>Campylobacter</i> Selective Supplement (Merck 1.02249)	309
57.05. CCDA Base, modified (Merck 1.00070)	309
57.06. CCDA Selective Supplement (Merck 1.00071)	310
57.07. Singlepath <i>Campylobacter</i> (Merck 1.04143)	310

57.01. Bolton Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.00068)

ISO 10272'ye göre *Campylobacter* aranmasında kullanılan bu besiyerinin bileşimi, Peptone from meat 10,0 g/L; Lactalbumin hydrolysate 5,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; a-ketoglutaric acid 1,0 g/L; Sodium pyruvate 0,5 g/L; Sodium metabisulphite 0,5 g/L; Na₂CO₃ 0,6 g/L; Haemin 0,01 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 500 mL damıtık su içinde 13,8 g tartılarak hazırlanır. Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Oda sıcaklığına geldiğinde 25 mL lize at serumu ve 1 şişe Bolton Broth Selektif katkısı (Merck 1.00069) ilave edilir, iyice karıştırılıp vida kapaklı steril şişelere dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri koyu kırmızı–siyah renklidir (bakınız; Ek B 44). 25 °C'da pH'sı 7,4±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki besin maddeleri hasar görmüş *Campylobacter* suşlarının canlandırılması için gereklidir. Mikroaerofilik ortamda inkübasyon önerilir. Vida kapaklı şişe kullanılıyor ise bu gerekli değildir. Refakatçi florada bulunan Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler selektif katkı bileşiminde bulunan Vancomycin, Cefoperazone ve Trimethoprim ile baskılanır. Cycloheximide maya ve küflerin gelişimini engeller. Selektif katkı 5 mL 1:1 oranında steril damıtık su ve alkol karışımı ile eritilir. Uygulamada 250 mL vida kapaklı şişelere 225'er mL besiyeri dağıtılır ve 25 g ya da mL gıda ilave edilir. Bu aşamadan sonra besiyerinin üst düzeyi ile kapak arasında yaklaşık 2 cm kalmış olması gereklidir. 37 °C'da 4 saat inkübasyondan sonra inkübasyona 41,5 °C'da 44 saat devam edilir ve ilk inkübasyonun başlangıcından itibaren 24 ve 48 saatlerde örnek alınarak *Campylobacter* Blood Free Selective Agar (modified CCDA) besiyerine (Merck 1.00070) sürme yapılır. Doğrudan Singlepath® *Campylobacter* (Merck 1.04143) ile analiz yapmak da mümkündür. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 72 adet 225 mL besiyeri hazırlanabilir. Selektif katkının 1 kutusunda 16 şişe olduğuna göre 1 kutu selektif katkı ile 32 analiz yapılabilir.

57.02. Bolton Broth Selective Supplement (Merck 1.00069)

Campylobacter analizinde kullanılan Bolton Broth için selektif katkıdır. Her şişede, 10 mg Vancomycin; 10 mg Cefoperazone; 10 mg Trimethoprim; 25 mg

Cycloheximide bulunur. Şişe içeriği 1:1 oranında karıştırılmış steril damıtık su ve alkol ile çözülür. 1 pakette 16 şişe vardır.

57.03. Campylobacter Selective Agar (Merck 1.02248)

Bileşimi, Peptone-protein mixture 21,0 g/L; Electrolyte 5,0 g/L; Starch, soluble 1,0 g/L; Agar 13,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 40 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık suda ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası 50 °C'a soğutulup %5–7 oranında defibrine koyun ya da at kanı ile her 200 mL bazal besiyeri için 1 şişe Campylobacter Selective Supplement (Merck 1.02249) ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir. Selektif katkıda (Merck 1.02249) bulunan vancomycine, polymixin ve trimethoprim refakatçi fekal floranın gelişimini engeller. Liyofilize formda antibiyotik olan katkı şişesine yaklaşık 2 mL steril damıtık su ilave edilerek kullanılır. İnkübasyon ya doğrudan karbon dioksit inkübatöründe ya da anaerob kavanozda *Campylobacter* türleri için özel anaerobik atmosfer koşulu sağlayan Anaerocult C (Merck 1.16275) kullanılarak yapılır. 500 g dehidre besiyeri ile 12,5 mL olacak şekilde 888 Petri kutusu hazırlanabilir. 1 litre besiyeri için 5 şişe selektif katkı kullanıldığına göre 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri için 63 şişe (4 kutu g/L; 16 şişe/kutu) selektif katkı gereklidir.

57.04. Campylobacter Selective Supplement (Merck 1.02249)

Campylobacter Selective Agar (Merck 1.02248) katkısıdır. Şişe içeriği, vancomycine 2,0 mg g/L; polymixin 0,05 mg ve trimethoprim 1,0 mg şeklinde olup, 2 mL steril damıtık su ile çözülür ve otoklavda sterilize edilip 45 °C'a soğutulmuş ve defibrine kan ilave edilmiş 200 mL Campylobacter Selective Agar besiyerine ilave edilir ve iyice karıştırılır. 1 kutuda 16 şişe vardır.

57.05. CCDA Base, modified (Merck 1.00070)

ISO 10272'ye uygun olan Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar ve Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base olarak da bilinen bu besiyerinin bileşimi, Peptone 20,0 g/L; Casein hydrolysate 3,0 g/L; Activated charcoal 4,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sodium desoxycholate 1,0 g/L; Sodium pyruvate 0,25 g/L; Ferrous sulphate 0,25 g/L; Agar 12,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 500 mL'ye 22,75 g olacak şekilde damıtık suda çözülür, kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrası 45–50 °C'a soğutulup, steril 2 mL damıtık su ile çözünmüş CCDA Selective supplement (Merck 1.00071) ilave edilir.

Karıştırılıp Petri kutularına 12,5 mL/Petri olacak şekilde dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri koyu kahve-siyah renkli olup, 2–8 °C'da 2 hafta depolanabilir. 25 °C'da pH'sı 7,4±0,2'dir. Bu besiyeri, İngiltere Tarım, Balıkçılık ve Gıda Bakanlığı tarafından gıdalarda *Campylobacter* aranması için kullanılan resmi metotta yer almaktadır. Bileşime giren maddeler enterik *Campylobacter* suşlarının gelişmesini destekler, selektif katkıdaki antibiyotikler Enterobacteriaceae üyeleri ile maya ve küflerin gelişimini baskılar. *C. jejuni*, *C. coli* ve *C. lari* suşlarının gelişimi 42 °C'a göre 37 °C'da daha yüksektir. *Campylobacter* türleri bu besiyerinde küçük ve açık renkli koloni oluşturur (bakınız; Ek B 36). İnokülasyon öncesinde besiyeri yüzeyi kurutulmuş olmalıdır. Aksi halde kolonilerde yayılma görülür. İnkübasyon anaerobik kavanozda Anaerocult C kullanılarak ya da özel torbası içinde Anaerocult C mini kullanılarak mikroaerofil ortamda 24–28 saat süre ile yapılır. İnkübasyon sırasında yüzeyin aşırı kurumamasından kaçınılması gerekir. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 879 Petri kutusu hazırlanabilir. Selektif katkının 1 paketinde 16 şişe vardır.

57.06. CCDA Selective Supplement (Merck 1.00071)

Campylobacter analizinde kullanılan mCCDA (Merck 1.00070) için selektif katkıdır. Her şişede, 5 mg Amphotericin B ve 16 mg Cefoperazone vardır. 2 mL steril damıtık suda çözüldükten sonra otoklavlanıp 45–50 °C'a soğutulmuş bazal besiyerine ilave edilir. Bileşimindeki Amphotericin maya ve küflerin, Cefoperazone ise Enterobacteriaceae üyelerinin gelişimini baskılar. Bir pakette 16 şişe vardır.

57.07. Singlepath Campylobacter (Merck 1.04143)

Bolton Broth (225 mL) besiyeri içinde homojenize edilen gıdadaki *Campylobacter* türlerinin hasar görmüş olmasından endişe ediliyorsa Bolton Broth besiyeri önce 37 °C'da 4 saat süre ile mikroaerofilik ortamda inkübe edilir, sonra inkübasyon sıcaklığı 41,5 °C'a çıkarılıp inkübasyona 44 saat daha devam edilir. Toplam 48 saat süren inkübasyondan sonra bu kültürden cam bir tüpe 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL Singlepath *Campylobacter* kitine uygulanır. 20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde *Campylobacter* olduğunu gösterir (bakınız; Ek A 14). Pozitif sonuç alındığında doğrulama için standart bir katı besiyerine sürme yapıp sonucun doğrulanması önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuç alınırsa analize devam etmenin gereği yoktur.

58. *Alicyclobacillus* Analiz Malzemesi

58.01. BAT Agar (Merck 1.07994)

IFU (Uluslararası Meyve Suyu Federasyonu) resmi analiz yöntemine göre *Alicyclobacillus* türlerinin analizi için hazırlanmış bir besiyeridir. Salça, soslar vb. gıda maddeleri analizinde de kullanılabilir. Bileşimi, Yeast extract 2,0 g/L; D(+) Glucose 5,0 g/L; CaCl₂ 0,25 g/L; MgSO₄ 0,5 g/L; Ammonium sulfate 0,2 g/L; KH₂PO₄ 3,0 g/L; Agar 18,0 g/L; ZnSO₄ 0,00018 g/L; CuSO₄ 0,00016 g/L; MnSO₄ 0,00015 g/L; CoCl₂ 0,00018 g/L; Boric acid 0,00010 g/L; Sodium molybdate 0,00030 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 29,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri pH'sı orijinal olarak agarın jel yapısını korumak için 5,3±0,2'ye ayarlanmıştır. Otoklav sonrası pH'yı 4,0±0,2'ye düşürmek için 45–50 °C'a soğutulan besiyerine steril 1 N H₂SO₄'den 1,7 mL eklenir, karıştırılıp Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı olup, buzdolabı sıcaklığında ve karanlıkta olacak şekilde 2 haftaya kadar depolanabilir. BAT Agar bütün *Alicyclobacillus* türlerinin gelişmesini destekler (bakınız; Ek B 37). Düşük pH ve yüksek inkübasyon sıcaklığı refakatçi floranın gelişimini baskılar. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL olacak şekilde 1379 Petri kutusu hazırlanabilir.

59. *Clostridium tyrobutyricum* Analiz Malzemesi

59.01. Bryant and Burkey Medium (Merck 1.01617)	311
59.02. Katı Parafin (Merck 1.07158)	312
59.03. Tyrobutyricum Broth Base	312

59.01. Bryant and Burkey Medium (Merck 1.01617)

Peynirlerde geç şişme etkeni olan *Clostridium tyrobutyricum* ve diğer *Clostridium* türlerinin belirlenmesi için besiyeridir. Çiğ ve pastörize süt, silaj vb. örneklerin analizinde de kullanılır. Bileşimi, Peptone from Casein 15,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; Meat extract 7,5 g/L; Sodium acetate 5,0 g/L; Cysteine HCl 0,5 g/L; Resazurin 0,0025 g/L; Calcium lactat 5,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 38 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilir, tüplere ya da erlenlere dağıtılıp 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve renksizdir. Besiyeri tercihen hazırlandığı gün kullanılmalıdır. Pembe renk görülürse besiyerinin oksijen aldığı anlaşılır, kaynatıldığında pembe rengin gitmesi gerekir. Oksijen varlığındaki pembe ve oksijen uzaklaştığındaki pembe rengin kaybolması

bileşimdeki redoks indikatörü olan resazurin ile belirginleşir. 25 °C'da pH'sı 5,9±0,2'dir. EMS yöntemi ile çalışıldığında anaerobik ortamın sağlanması için tüpler önce 10 dakika kadar kaynatılır, oda sıcaklığına soğutulur, önceden 75 °C'a 15 dakika ya da 80 °C'da 5 dakika tutularak pastörize edilip, ardışık seyreltileri yapılmış olan örnekten ekimden sonra tüplerin üstü 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilmiş katı parafin (Merck 1.07158) ya da su agar ile 2 cm kalınlık olacak şekilde kaplanır. Taze peynirlerde hasar görmüş *Cl. tyrobutyricum* analizinde 62,5 °C'da 30 dakikalık uygulamalara da rastlanılmaktadır. 37 °C'da 7 güne kadar süren inkübasyondan sonra katı parafin ya da su agar tabakasının yukarı doğru itilmesi laktattan gaz oluştuğunu gösterir ve bu tüpler pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Materyalin önceden pastörize edilmesi refakatçi spor oluşturmeyen bakterileri elimine eder. Besin maddesi kompozisyonu *Clostridium* 'ların gelişmesini, sodyum asetat ise sporların germine olmasını sağlar.

59.02. Katı Parafin (Merck 1.07158)

Hazır ticari preparattır. Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Kolaylıkla eritilerek kullanılabilir.

59.03. Tyrobutyricum Broth Base

Daha önce Merck 1.11734 kod ile üretilen besiyeri ticari üretimden kaldırılmış, yerine Bryant and Burkey Medium (Merck 1.01617) koyulmuştur. Bileşimi, Peptone from Casein 15,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; Meat extract 10,0 g/L; Sodium acetate 5,0 g/L; L-cysteine HCl 0,5 g/L; Resazurin sodium 0,0025 g/L; Sodium lactat 5,0 g/L şeklindedir. Besiyeri ile ilgili kullanım şekli Bryant and Burkey Medium'da olduğu gibidir.

60. Anaeroblar için Analiz Malzemesi, Katkıları ve Sistemleri

60.01. Anaerobik İnkübasyon Sistemleri	313
60.02. Fluid Thioglycollate Medium (Merck 1.08191)	317
60.03. Thioglycollate Broth (Merck 1.08190)	318
60.04. Reinforced Clostridial Agar (Merck 1.05410)	318
60.05. Reinforced Clostridial Medium (Merck 1.05411)	318
60.06. Sıvı Parafin (Merck 1.07160)	319

60.01. Anaerobik İnkübasyon Sistemleri

Anaerob olarak tanımlanan mikroorganizmalar gelişmeleri için özel atmosfer koşullarına gerek duyarlar. Bu grup içinde havayı (daha doğru bir deyimle oksijeni) farklı derecelerde tolere eden gruplar vardır. Anaerob bakterilerin gelişimi için ortamda oksijen kesinlikle istenmez iken aerotolerantlar belirli bir miktar oksijeni tolere edebilirler. Mikroaerofilik/ kapneik mikroorganizmalar ise gelişmeleri için çok az oksijen yanında belirli konsantrasyonlarda CO₂'e gerek duyarlar. Mutlak anaeroblar ile çalışılırken inokülasyon aşamasında da anaerob atmosfer gerekir. Gıda endüstrisinde aranacak/sayılacak anaeroblar için bu şekilde anaerob inokülasyonlara gerek yoktur. Sadece gıda örneğinin analize hazırlanması aşamasında aşırı hava ile temasından kaçınılması gerekir.

Anaerobik mikroorganizmalar insan ve hayvanların normal bakteriyel florası içinde yer alırlar. Tıbbi mikrobiyolojideki patojenik önemleri ve gıda hijyenindeki önemli rollerine karşın uzun süre ihmal edilmişler ve gerek tıbbi mikrobiyolojide gerek gıda hijyeninde aerob mikroorganizmalar ile çalışılmıştır. Özellikle son 20-25 yıldan buyana anaerobların kültürasyonundaki gelişmeler ile bu grup mikroorganizmalar daha iyi olarak tanınmışlar ve bunlara verilen önem artmıştır.

Bacteriodes, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* türleri klinik mikrobiyolojide önemli iken *Clostridium* türleri hem klinik mikrobiyolojide hem de gıda mikrobiyolojisinde önem taşır. Bu grup mikroorganizmaların morfolojileri, Gram reaksiyonları ve doğal habitatları önemli değişiklikler gösterirken tümünün ortak yanı gelişme ve çoğalmaları için analizlerin tüm aşamalarında anaerobik ortama gerek duymalarıdır.

Neisseria, *Campylobacter* ve *Haemophilus* türleri mikroaerofilik/kapneik bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Bunlar arasında *Campylobacter* türlerinin gıda mikrobiyolojisindeki önemi giderek artmaktadır. Bu gruba giren bakteriler belirli miktarda CO₂ isterler. Bu nedenle geliştirilmeleri için anaerobik bakterilerden farklı atmosfer gerekir.

Anaerocult Sistemi

Anaerocult ürünleri (A, A mini, P, IS, C, C mini) temel prensiplere dayanarak anaerobik veya mikroaerofilik/ kapneik ortam üreten sistemlerdir.

Anaerocult ürünlerinde su ile reaksiyon sonunda verilen bir hacim (anaerobik kavanoz veya inkübasyon torbası) içinde atmosferik oksijenin tümünün ya da bir kısmının bağlanması ve aynı anda CO₂ açığa çıkmasını sağlayan bileşimler vardır. Reaksiyon sonunda atmosfer CO₂ açısından zenginleşirken oksijen tümüyle (anaerobik ortam) ya da kısmen (mikroaerofilik/ kapneik ortam) uzaklaştırılmış olur.

Anaerocult sistemlerinde ilave bir katalist kullanımına gerek yoktur. Kullanım basit ve güvenlidir. Yeterli, hızlı ve istenen düzeyde oksijen ve CO₂ kısmi basıncı sağlanır. Analiz edilecek örnek sayısına göre farklı seçenekler sağlanmıştır. Böylece kullanımı ekonomiktir. Tipik bileşimleri kiselgur, demir tozu, sitrik asit ve kalsiyum karbonattır. Anaerocult ürünlerinde tehlikeli olabilecek O₂/H₂ sınırına ulaşmaz.

Anaerotest (Merck 1.15112)

Anaerotest, inkübasyonda kullanılan kapalı kaplarda anaerobik atmosferin kontrolü için kullanılan test şeritleridir. Test şeridinin mavi bölümü metilen mavisini içerir. Bu boya oksijen varlığında okside olarak mavi renk taşıırken oksijensiz ortamda boyanın yükseltgenmesi sonunda renk beyazlaşır. Bu reaksiyon dönüşümlü olduğu için oksijen ile temasında bir kez daha mavileşir.

Reaksiyon, şeridin mavi kısmına 1 damla su damlatılması ile başlar. Mavi zon anaerobik atmosfer kontrolü yapılacak inkübasyon kabına (anaerobik kavanoz ya da torba) serbest atmosfere temas edecek şekilde yerleştirilmeli, Petri kutusu ya da diğer yüzeylere değmemelidir.

Anaerotest şeritleri mikroaerofilik/kapneiklerin inkübasyon ortamında kalan kısmi oksijen varlığı nedeni ile bu grup mikroorganizmaların inkübasyonu için uygun atmosfer ortamı sağlayan Anaerocult C ve Anaerocult C mini sistemleri ile birlikte kullanılamaz.

Bir pakette 50 şerit vardır. Dolayısı ile 50 anaerobik inkübasyon ortamı kontrolünde kullanılır. İnkübasyon sırasında şeridin beyaz olması anaerobik atmosfer varlığını gösterir.

Anaeroclip (Merck 1.14226)

Anaeroclip, Anaerocult A mini, P, IS ve C mini ile kullanılan anaerobik torbaların mekanik olarak kapatılmasını sağlayan özel kıskaçtır. Bu kapatma çubuğu sayesinde bu torbaların kapatılması için diğer kapatma sistemlerine gerek kalmaz. Anaeroclip kıskaçları defalarca kullanım sağlayacak materyalden yapılmıştır. 1 pakette 25 kapatma çubuğu bulunur.

Anaerobik Kavanoz (Merck 1.16387)

2,5 L kapasiteli, anaerotest şeritleri için özel bölmesi olan 9-10 cm çaplı standart 12 Petri kutusu alabilen kavanozdur. Sadece kavanoz gövdesi ve kapaktan ibaret olması kolay kullanım özelliği sağlar. Oksijen mekanik olarak değil, kimyasal olarak uzaklaştırıldığı için sistemde manometre ve gaz muslukları kullanımına

gerek duyulmamıştır. Yüksek kaliteli materyalden imal edilmiş olması kavanozda sızdırmazlığı tam olarak sağlar.

Petri Sepeti (Merck 1.07040)

Anaerobik kavanoza Petri kutularının yerleştirilmesi için kullanılan tel sepettir. 9 cm çaplı standart 12 Petri kutusunu alacak şekilde dizayn edilmiştir.

Anaerocult A (Merck 1.13829)

Anaerobik kavanozda 12 Petri kutusuna kadar olan anaerobik inkübasyon ortamı sağlamak için kullanılan poşettir. Reaksiyonun başlaması için sadece su ilavesi yeterlidir. Atmosferik oksijen kimyasal olarak bağlandığı için hidrojen ile reaksiyona girmez. Kimyasal bileşimin konulduğu özel kağıt ilave edilen suyun tam olarak difüzyonuna, atmosferik oksijenin kimyasal olarak bağlanmasına ve CO₂ çıkmasına olanak sağlar. Bu şekilde anaerobik kavanozda oksijen azalırken CO₂ miktarı artar.

Anaerobik kavanoza Petri kutuları yerleştirildikten sonra Anaerotest şeridine 1 damla su damlatılır ve şerit, kavanozdaki özel bölmeye koyulur. Anaerocult A poşetine 35 mL su ilave edilip kavanoza yerleştirilir ve kavanoz kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 kutu Anaerocult A içinde 10 poşet vardır.

Anaerocult C (Merck 1.16275)

Mikroaerofilik/kapneik mikroorganizmaların anaerobik kavanozdaki özel atmosferik koşullarda inkübasyonu için kullanılan poşettir. Özel formülasyonu ile literatürde önerildiği şekilde anaerobik kavanoz içinde hacim olarak %8-10 CO₂ ve %5-6 oksijen son konsantrasyonu sağlar. Katalist kullanılan diğer sistemlerden farklı olarak açığa çıkan enerji az olduğu için kavanozda istenmeyen sıcaklık yükselmesi olmaz ve böylece mikroorganizmaların zarar görmesi engellenir.

Petriler anaerobik kavanoza yerleştirildikten sonra Anaerocult C poşeti yavaşça sallanır ve poşet üzerindeki yazılı kısım üzerine 6 mL su ilave edilip anaerobik kavanoza yerleştirilir. Anaerobik kavanoz kapağı kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 kutu Anaerocult C içinde 25 poşet bulunur.

Anaerocult A mini (Merck 1.01611)

4 Petri kutusunun anaerobik inkübasyonu için kullanılır. Petri kutuları özel torbaya yerleştirildikten sonra Anaerotest poşeti 1 damla su ile ıslatılıp test kısmı Petri kutusu ve/veya başka bir yere deymeyecek şekilde yerleştirilir. Anaerocult A mini üzerine 8 mL su ilave edilip torbaya konulur ve Anaeroclip ile torbanın ağzı

kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 paket Anaerocult A mini içinde 25 Anaerocult A poşeti ve 25 özel inkübasyon torbası vardır.

Anaerocult P (Merck 1.13807)

1 Petri kutusunun anaerobik inkübasyonu için kullanılır. Petri kutuları özel torbaya yerleştirildikten sonra Anaerotest 1 damla su ile ıslatılıp test kısmı Petri kutusu ve/veya başka bir yere değmeyecek şekilde yerleştirilir. Anaerocult P mini üzerine 3 mL su ilave edilip torbaya konulur ve Anaeroclip ile torbanın ağzı kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 paket Anaerocult P içinde 25 Anaerocult P poşeti ve 25 özel inkübasyon torbası vardır.

Anaerocult C mini (Merck 1.13682)

Mikroaerofilik/kapneik mikroorganizmaların özel inkübasyon koşullarını 4 Petri kutusunun yerleştiği özel torba içinde sağlayan sistemdir. 3 mL su ile ıslatılan poşet içinde Petri kutularının bulunduğu özel torbaya yerleştirilip torba ağzı Anaeroclip ile kapatılır ve istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 paket Anaerocult C mini içinde 25 Anaerocult C mini poşeti ve 25 özel inkübasyon torbası vardır.

Anaerocult IS (Merck 1.16819)

2 adet mikrotiter plate veya 1 adet identifikasyon kitinin anaerobik inkübasyonu için kullanılır. 6 mL su ile ıslatılan poşet içinde su ile ıslatılmış Anaerotest ile mikrotiter plate veya identifikasyon kiti olan özel torbaya yerleştirilir. Torba ağzı Anaeroclip ile kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır.

60.02. Fluid Thioglycollate Medium (Merck 1.08191)

Anaerobların geliştirilmesinde kullanılır. Bileşimi, Peptone from Casein 15,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; D(+)-glucose 5,5 g/L; L-cystine 0,5 g/L; NaCl 2,5 g/L; Sodium thioglycollate 0,5 g/L; Sodium resazurin 0,001 g/L; Agar 0,75 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 30 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. 25 °C'da pH'sı 7,1±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki indirgeyici bileşikler olan thioglycollate ve cystine zor gelişen anaeroblar için dahi yeterli bir anaerobik ortam sağlar. Bu bileşiklerin sülfidril grupları arsenik, cıva ve diğer ağır metalleri inaktive ettikleri için bu besiyeri ağır metaller ile yoğun kontamine olmuş gıdaların ya da ağır metallerin koruyucu olarak kullanıldığı gıdaların analizinde uygundur. Bileşimdeki yoğun vizkozite oksijenin hızlı alımını engellerken, redoks indikatörü sodyum resazurin

oksijenin yüksek konsantrasyona erişmesini besiyerinin berrak sarı rengini kırmızıya dönüştürmesi ile belirtir. Bu besiyeri her zaman taze hazırlanmalı ve besiyerinde kaynatma ile uzaklaşmayan pembelik varsa kullanılmamalıdır. İnokülasyonda anaerobik ortamın daha güvenli sağlandığından emin olunmak için aşılama tüpün dibine doğru yapılmalıdır. Anaerobik ortamın sağlanmasını güvenceye almak üzere inokülasyondan sonra tüpün üzerinin 1 cm kalınlıkta olacak şekilde (2 mL) katı parafin (Merck 1.07160) ya da Su Agar ile örtülmesi tavsiye edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1666 adet 10 mL tüp hazırlanabilir.

60.03. Thioglycollate Broth (Merck 1.08190)

Anaerobların geliştirilmesinde kullanılır. Bileşimi, Pepton from Casein 15,0 g/L; Yeast extract 5,0 g/L; D(+)-glucose 5,5 g/L; L-cystine 0,5 g/L; NaCl 2,5 g/L; Sodium thioglycollate 0,5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 29 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. 25 °C'da pH'sı $7,1 \pm 0,2$ 'dir. Besiyeri bileşimindeki indirgeyici bileşikler olan thioglycollate ve cystine zor gelişen anaeroblar için dahi yeterli bir anaerobik ortam sağlar. Bu bileşiklerin sülfidril grupları arsenik, cıva ve diğer ağır metalleri inaktive ettikleri için bu besiyeri ağır metaller ile yoğun kontamine olmuş gıdaların ya da ağır metallerin koruyucu olarak kullanıldığı gıdaların analizinde uygundur. Bu besiyeri her zaman taze hazırlanmalıdır. Anaerobik ortamın sağlanmasını güvenceye almak üzere inokülasyondan sonra tüpün üzerinin 1 cm kalınlıkta olacak şekilde (2 mL) katı parafin (Merck 1.07160) ya da Su Agar ile örtülmesi tavsiye edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1724 adet 10 mL tüp hazırlanabilir.

60.04. Reinforced Clostridial Agar (Merck 1.05410)

Anaerobların analizinde kullanılan bu besiyerinin bileşimi, Meat extract 10,0 g/L; Pepton from Casein 10,0 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; D(+) Glucose 5,0 g/L; Starch 1,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sodium acetate 3,0 g/L; L-cysteinium chloride 0,5 g/L; Agar 12,5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 50 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahverengindedir, 25 °C'da pH'sı $6,8 \pm 0,2$ 'dir. Gram negatif refakatçi florayı baskılamak için gerekirse 0,02 g/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş Polymyxin B Sulfate (Merck 1.06994) otoklav çıkışı 45 °C'a soğutulmuş besiyerine ilave edilir. Bu besiyeri gıdalar, klinik örnekler ve diğer materyaldeki *Clostridium*, diğer anaeroblar ve fakültatif anaerobların geliştirilmesi ve sayılması içindir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve

sarımsı kahve rengindedir. Amaca uygun olarak materyal ekim öncesi pastörize edilebilir. Ekim genellikle dökme kültür şeklinde yapılır ve anaerobik inkübasyon uygulanır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri kutusu hesabı ile 800 Petri kutusu hazırlanabilir.

60.05. Reinforced Clostridial Medium (Merck 1.05411)

Anaerobların analizinde kullanılan bu besiyerinin bileşimi, Meat extract 10,0 g/L; Peptone 5,0 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; D(+)-glucose 5,0 g/L; starch 1,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sodium acetate 3,0 g/L; L-cysteinium chloride 0,5 g/L; Agar 0,5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 33 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Gram negatif refakatçi florayı baskılamak için gerekirse 0,02 g/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş Polymyxin B Sulfate otoklav çıkışı oda sıcaklığına soğutulmuş besiyerine ilave edilir. Bu besiyeri gıdalar, klinik örnekler ve diğer materyaldeki *Clostridium*, diğer anaeroblar ve fakültatif anaerobların geliştirilmesi ve sayılması içindir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Amaca uygun olarak materyal ekim öncesi pastörize edilebilir. Ekimden sonra tüplerin üzerine 1 cm kalınlıkta (2 mL) katı parafin (Merck 1.07160) ilave edilir ya da anaerobik inkübasyon uygulanır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1515 adet 10 mL tüp hazırlanabilir.

60.06. Sıvı Parafin (Merck 1.07160)

Hazır ticari preparattır. Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilerek kullanılır.

61. Lipolitik Bakteriler Analiz Malzemesi

61.01. Tributyrin Agar (Merck 1.01957)

Lipolitik bakteri analizinde kullanılan bu besiyerinin bileşimi, Peptone from meat 2,5 g/L; Pepton from Casein 2,5 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; Agar 12,0 g/L'dir. 20 g/L dehidre besiyeri üzerine 10 mL/L olacak şekilde Neutral Tributyrin (Glycerol tributyrinate g/L; Merck 1.01958) katılır ve damıtık su içinde kaynatılarak eritilir. Manyetik taş ile birlikte otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Manyetik karıştırıcıda karıştırılarak steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve sarımsıdır, 25 °C'da pH'sı 7,5±0,2'dir. Besiyeri katılaştığında

homojen bir bulanıklık göstermelidir. Aksi halde hatalı sonuç alınabilir. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve sarı renklidir. Buzdolabında 1 hafta depolanabilir. Optimum koşullarda 2–3 gün inkübasyondan sonra etrafında berrak zon görülen koloniler lipolitik bakteri olarak sayılır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 2020 Petri hazırlanır. 1 kutu dehidre besiyeri için 100 mL olan Neutral Tributyrin (Glycerol tributyrinate g/L; Merck 1.01958)'den 2,5 şişe gerekir.

62. Proteolitik Bakteriler Analiz Malzemesi

62.01. Calcium Caseinate Agar (Merck 1.05409)

Proteolitik bakterilerin analizinde kullanılan bu besiyerinin bileşimi, Peptone from meat 4,0 g/L; Meat extract 2,0 g/L; Peptone from Casein 2,0 g/L; Calcium caseinate 3,5 g/L; Calcium Chloride dihydrate 0,2 g/L; tri-potassium citrate monohydrate, 35 g/L; Na₂HPO₄ anhydrous 0,105 g/L; KH₂PO₄ 0,035; NaCl 5,0 g/L; agar 13,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 30,2 g/L olacak şekilde önce soğuk damıtık su içinde iyice karıştırılır, sonra kaynatılarak tüm bileşenlerin iyice erimesi sağlanır. İstenirse 5 g/L süt tozu ilave edilebilir. Manyetik taş ile birlikte otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Manyetik karıştırıcıda karıştırılarak steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri katılaştığında sarımsı kahve renkte olup, homojen bir bulanıklık göstermelidir. 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Optimum koşullarda 2-3 gün inkübasyondan sonra etrafında berrak zon görülen koloniler proteolitik bakteri olarak sayılır (bakınız; Ek B 55). Zonların belirginleştirilmesi için sayım öncesi Petri kutusuna 5 mL kadar %5 asetik asit (Merck 1.00062) ilave edilebilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1324 Petri hazırlanır.

63. Rop Sporu Analiz Besiyeri ve Katkıları

63.01. Dextrose Casein-peptone Agar (Merck 1.10860)	320
63.02. Nutrient Broth (Merck 1.05443)	321

63.01. Dextrose Casein-peptone Agar (Merck 1.10860)

Gıdalarda düz ekşime yapan *Bacillus* türleri ve rop sporu analizinde kullanılan bu besiyerinin bileşimi, Peptone from Casein 10,0 g/L; D(+) Glucose 5,0 g/L;

Bromocresol purple 0,04 g/L; Agar 12,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 27 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav çıkışı yaklaşık 50 °C'a soğutulup Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve menekşe renklidir, 25 °C'da pH'sı $6,8 \pm 0,2$ 'dir. Bakteri gelişimi ve glikozdan asit oluşumu sonunda bromocresol purple indikatörü nedeni ile koloni etrafında sarı renkli zon oluşur. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/ Petri kutusu hesabı ile 1481 adet Petri kutusu hazırlanabilir.

63.02. Nutrient Broth (Merck 1.05443)

Çok amaçlı genel besiyeridir. Bileşimi, Peptone from Meat 5,0 g/L ve Meat extract 3,0 g/L'dir. Dehidre besiyeri 8 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilir, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Besiyeri bileşimine %0,05 potasyum tellurit ilavesi ile *Listeria monocytogenes* için zenginleştirme besiyeri hazırlanabilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renkli olup, 25 °C'da pH'sı $7,0 \pm 0,2$ 'dir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 62,5 litre besiyeri hazırlanır.

64. Laktobasil Analiz Malzemesi

64.01. MRS Agar (Merck 1.10660)	321
64.02. MRS Broth (Merck 1.10661)	322

64.01. MRS Agar (Merck 1.10660)

De Man, Rogosa ve Sharp tarafından geliştirilen bu besiyeri laktobasillerin her türlü materyalden zenginleştirilmesi, geliştirilmesi ve izolasyonu için kullanılır. Bileşimi, Peptone from Casein 10,0 g/L; Meat extract 10,0 g/L; Yeast extract 4,0 g/L; D(+) Glucose 20,0 g/L; K_2HPO_4 2,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; di-ammonium hydrogen citrate 2,0 g/L; Sodium acetate 5,0 g/L; $MgSO_4$ 0,2 g/L; $MnSO_4$ 0,04 g/L; Agar 14,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 68,2 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri, *Bifidobacterium* spp. için kullanılacak ise sterilizasyonun 118 °C'da 15 dakika olarak yapılması önerilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahve renkli ve 25 °C'da pH'sı $5,7 \pm 0,2$ 'dir. Besiyeri bileşimindeki polisorbit, asetat, magnezyum ve manganez laktobasiller için gelişmeyi destekleyici faktörler olup, buna bağlı olarak MRS Agar, diğer mikroorganizmaları inhibe etmekten ziyade, laktobasilleri teşvik edici bir özellik gösterir. Laktobasillerin gelişmesini teşvik eden bu maddeler

refakatçi flora üzerinde zayıf bir inhibisyon yapar. Laktobasiller bu besiyerinde sarı renkli, düzgün ya da iğ şeklinde koloni oluşturur (bakınız; Ek B 38) Bu durumda laktobasiller dışındaki bakteriler de MRS Agar besiyerinde gelişirler. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri kutusu hesabı ile 604 Petri kutusu hazırlanır.

64.02. MRS Broth (Merck 1.10661)

De Man, Rogosa ve Sharp tarafından geliştirilen bu besiyeri laktobasillerin her türlü materyalden zenginleştirilmesi, geliştirilmesi ve izolasyonu için kullanılır. Bileşimi, Peptone from Casein 10,0 g/L; Meat extract 8,0 g/L; Yeast extract 4,0 g/L; D(+) Glucose 20,0 g/L; K₂HPO₄ 2,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; di-ammonium hydrogen citrate 2,0 g/L; Sodium acetate 5,0 g/L; MgSO₄ 0,2 g/L; MnSO₄ 0,04 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 52,2 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, amaca uygun olarak tüplere ve/veya erlenlere dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri, *Bifidobacterium* spp. için kullanılacak ise sterilizasyonun 118 °C'da 15 dakika olarak yapılması önerilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahverenginde olup, 25 °C'da pH'sı 5,7±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki polisorbitat, asetat, magnezyum ve mangan laktobasiller için gelişmeyi destekleyici faktörler olup, buna bağlı olarak MRS Broth, diğer mikroorganizmaları inhibe etmekten ziyade, laktobasilleri teşvik edici bir özellik gösterir. Laktobasillerin gelişmesini teşvik eden bu maddeler refakatçi flora üzerinde zayıf bir inhibisyon yapar. Bu durumda laktobasiller dışındaki bakteriler de MRS Broth besiyerinde gelişirler. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 9,5 litre besiyeri hazırlanır.

65. *Pseudomonas* Analiz Malzemesi

65.01. GSP Agar (Merck 1.10230).....	322
65.02. <i>Pseudomonas</i> Selective Agar Base (Cetrimide Agar, Merck 1.05284)	322
65.03. Glycerol %87 (Merck 1.04091)	323

65.01. GSP Agar (Merck 1.10230)

Bakınız; 56.02. Bölüm.

65.02. Pseudomonas Selective Agar Base (Cetrimide Agar, Merck 1.05284)

Pseudomonas Selective Agar olarak da anılır. Bileşimi, Peptone from gelatin 20,0 g/L; magnesium chloride 1,4 g/L; potassium sulfate 10,0 g/L; N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromide (cetrimide) 0,3 g/L; Agar 13,0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 44,5 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak eritilir, 10 mL/L olacak şekilde Glycerol (Merck 1.04094) ilave edilir. Otoklavda 121 °C'da sterilize edilip Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve açık kahve rengindedir. Her ne kadar refakatçi floranın baskılanması Cetrimide ile yapılyorsa da daha iyi bir baskılama için 15 mg/L konsantrasyonda nalidixic asit (Merck 1.06219) ilavesi önerilir. Esas olarak *Pseudomonas aeruginosa* izolasyonu ve ön tanımlanması için kullanılır. *Pseudomonas aeruginosa* besiyeri bileşimindeki 0,3 g/L konsantrasyondaki cetrimid'e dirençlidir ve bu konsantrasyonda pigment oluşumu engellenmez. *Pseudomonas aeruginosa* bu besiyerinde 35 °C'da aerobik koşullarda 48 saat inkübasyondan sonra mavi–yeşil pigmentli koloni oluşturur (bakınız; Ek B 39) ve uzun dalga boylu UV lambası ile (Merck 1.13203) floresan verir. Kesin tanımlama için ilave testler önerilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 mL/Petri kutusu hesabı ile 898 Petri kutusu hazırlanır.

65.03. Glycerol %87 (Merck 1.04091)

Hazır ticari preparat olarak kullanılır.

Kaynakça

- Acar, J. 2003. Mikroorganizmaların Öldürülmesi. Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş (Eds.). META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 605 s.
- Anonymous 1995. Muayene ve Deney için Numune Alma Metotları- Bölüm 1: Parti Muayene için Kabul Edilebilen Kalite Seviyesine Göre Numune Alma Planları. TS 2756-1. Ankara 68 s.
- Anonymous 1996. Mikrobiyoloji – Muhtemel *Escherichia coli* Sayımı için Genel Kurallar En Muhtemel Sayı Tekniği, TS 6063. Nisan 1996
- Anonymous 1996. Mikrobiyoloji -Koliform Grubu Bakteri Sayımı için Genel Kurallar -En Muhtemel Sayı Tekniği TS 7725 ISO 4831. Ankara, 13 s.
- Anonymous 1997 TS ISO 9308-2; Su Kalitesi - Koliform Organizmalar, Isıya Dayanıklı Koliform ve *Escherichia coli* Varsayılan Organizmaların Tespit Edilmesi ve Sayımı - Bölüm 2: Çoklu Tüp (En Muhtemel Sayı) Metodu
- Anonymous 1997. Gıda ve Yem Maddelerinin Mikrobiyolojisi –*Listeria monocytogenes* 'in Aranması ve Sayımı Metodu Bölüm 1 : Arama Metodu TS EN ISO 11290-1. Ankara, 20 s.
- Anonymous 2001. Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi –Deney Numunelerinin Başlangıç Süspansiyonunun ve Ondalık Seyreltilerinin Hazırlanması için Genel Kurallar TS 6235 EN ISO 6887-1
- Anonymous 2001. Kanatlı Etleri ve Gıda Güvenliği. Kanatlı Ar-Ge Yayını no: 3. 186 s
- Anonymous 2002. Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi - *Salmonella* Aranması için Yatay Yöntem. TS EN 12824. Ankara, 28 s.
- Anonymous 2002. Süt ve Süt Ürünleri - Muhtemel *Escherichia coli* Sayımı Bölüm: 2, 4-Metilyumbelliferil - β - D- Glukuronit (MUG) Kullanılarak En Muhtemel Sayı Tekniği. TS ISO 11866-2. Türk Standartlar Enstitüsü, Ankara, 11 s.
- Anonymous 2005. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Milk Laboratory Evaluation form. Standard Plate Count, Coliform, and Simplified Count Methods. Form FDA 2400a (3/01) <http://forms.psc.gov/forms/FDA/FDA-2400a.pdf>. 7 s.
- Anonymous 2005. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Milk Laboratory Evaluation form. Cultural Procedures –General Requirements. Form FDA 2400 (3/01) <http://forms.psc.gov/forms/FDA/FDA-2400.pdf>. 7 s.
- Anonymous 2005. Microbiology History <http://www.bionewsonline.com/pub/pub5.htm>
- Anonymous 2005. www.mikrobiyoloji.org web sayfası.

Arda, M. 1978. Genel Bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları no: 342. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 521 s.

Arda, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Medisan Yayın Serisi no 46, Ankara. 548 s.

Atlas, R.M. 1996. Microbiological Culture Media 2nd Ed. CR Press, New York 1706 p.

Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Beşe, M. 1974. Mikrobiyolojide Kullanılan Biyokimyasal Testler ve Besiyerleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın no 298. 536 s.

Çakır, İ. 2000. *Aeromonas hydrophila*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Çakır, İ. 2000. *Escherichia coli* O157:H7. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Çakır, İ. 2000. Koliform Grup Bakteriler ve *E coli*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Çakır, İ., Doğan, H.B. 2000. Biyolojik Stabilité. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Çakır, İ., Doğan, H.B. 2000. Membran Filtrasyon Uygulamaları. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Çakır, İ., Doğan, H.B., Tükel, Ç. 2000. Proteolitik Bakteriler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Çakmakçı, L., Karahan, A.G. 1995. Mikrobiyolojiye Giriş. ISVAK Yayın no: 5. 227 s.

Çotuk, A. 2003. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 138 sayfa kitap.

Davidson, P.M., Roth, L.A., Gambrel-Lenarz, S.A. 2004. Coliform and Other Indicator Bacteria. 2004. Chapter 7. Eds: Wehr, H.M., Frank, J.F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Association, Washington DC, 570 p.

Davis, G.L., Hickey, P.J. 2004. Media and Dilution Water Preparation. Chapter 4. Eds: Wehr, H.M., Frank, J.F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Assoc., Washington DC, 570 p.

Denizel, T. 1986. Gıda Mikrobiyolojisi 1. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No: 18. Bursa, 143 s.

Doğan, H.B. 200. *Alicyclobacillus* spp. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Doğan, H.B. 2000. *Listeria monocytogenes*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Doğan, H.B., Tükel, Ç. 2000. Toplam (Aerobik Mezofil) Bakteri. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Doğan, H.B., Çakır, İ. 2000. *Clostridium tyrobutyricum*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Doğan, H.B., Çakır, İ., Tükel, Ç. 2000. Rope Sporu. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Doğan, H.B., Tükel, Ç. 2000. *Campylobacter jejuni*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Duncan, S.E., Yaun, B.R., Summer, S.S. 2004. Microbiological Methods for Dairy Products Chapter 9. Eds: Wehr, H.M., Frank, J.F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Association, Washington DC, 570 p

Dyer, R.L., Frank, J.F., Johnson, B., Hickey, P. 2004. Microbiological Tests for Equipment, Containers, Water and Air. Chapter 13. Eds: Wehr, H.M., Frank, J.F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Association, Washington DC, 570 p

Frank, J.F., Yousef, A.E. 2004. Tests for Group of Microorganisms. 2004. Chapter 8. Eds: Wehr, H.M., Frank, J.F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Assoc., Washington DC, 570 p.

Graham, T. 2004. Sampling Dairy and Related Products. Chapter 3. Eds: Wehr, H.M., Frank, J.F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Association, Washington DC, 570 p

Gürgün, V., Halkman, A.K. 1988. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 7. San Matbaası, Ankara, 160 s.

Güven, S. 2002. Genel Mikrobiyoloji. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. 173 s.

- Halkman, A.K. 1995. Mikrobiyolojide Kullanılan Besiyerleri. Orkim Ltd. Şti. Yayını. Armoni Matbaacılık, Ankara, 72 s.
- Halkman, A.K., Akçelik, M. 2000. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi 1 Temel İlkeler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Halkman, A.K., Ayhan, K. 2000. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi 2 Mikroorganizma Sayımı. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Halkman, A.K., Doğan, H B. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı; Genel Bilgiler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Halkman, A.K., Doğan, H B. 2000. Kültür Koruma. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Halkman, A.K., Noveir M.R., Doğan H.B. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 Serotipi. Orkim Ltd. Yayını, Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 44 s.
- Halkman, A.K., Tunail, N. 2000. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi 3. İzolasyon, İdentifikasyon. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühend. Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Harrigan, W.F. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology. Academic Press, California. 532 p.
- Kaleli, D., Özkaya, D.F. 2000. *Bacillus cereus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Kaleli, D., Özkaya, D.F. 2000. Enterokoklar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Karahan, A.G., Cicioğlu Arıdoğan, B., Çakmakçı, L. 2002. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fak.. Yayın no 24. 171 s.
- Karapınar, M, Gönül Ş. A. 2003. Gıda Kaynaklı Mikrobiyel Hastalıklar. Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş (Eds.). META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 605 s.
- Köşker, Ö., Çakmakçı, L. 1983. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Teksir no: 111. Ankara, 75 s.
- Kuleaşan, H. 2000. *Clostridium perfringens*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Kuleaşan, H., Özkaya, D.F. 2000. *Vibrio parahaemolyticus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliğı Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Laird, D.T., Gambrel-Lenarz, S.A., Scher, F.M., Graham, T.E., Reddy, R. 2004. Microbiological Count Methods. Chapter 6. Eds: Wehr, H.M., Frank, J.F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Association, Washington DC, 570 p.

Leloğlu, N., Eroğan, N. 1979. Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Atatürk Üniversitesi. Yayınları no: 549. Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, 168 s.

MacFaddin, J.F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd Edition. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 912 p.

Öner, M. 2001. Genel Mikrobiyoloji, 4. Baskı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi no 94. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova İzmir. 380 s.

Özçelik, S. 1998. Genel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no : 1. 259 s.

Özçelik, S. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no 7. 135 s.

Özkaya, D.F. 2000. Genel İdentifikasyon Testleri. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliğı Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Özkaya, D.F. 2000. *Salmonella*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliğı Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Özkaya, D.F., Kuleaşan, H. 2000. Maya ve Küf. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliğı Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Reddy, R. Graham, T.E., Laird, D.T., Maturin, L.J. 2004. Laboratory Quality Assurance and Safety. Chapter 2. Eds: Wehr, H.M., Frank, J.F. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Association, Washington DC, 570 p.

Sekin, Y., Karagözlü, N. 2004. Gıda Mikrobiyolojisi; Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar. 4. Basımdan Çeviri. Yazan Klaus Pichhardt. Literatür Yayınları no 115. İstanbul, 358 s.

Şahbaz, F., Cemeroğlu, B., Acar, J. 1996. Gıda Mühendisliğinde Sterilizasyon. Düzeltilmiş 2. Baskı. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları Ders Notları No: 37. 134 s.

Şahin, İ., Korukluoğlu, M. 2000. Küf-Gıda-İnsan. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın no 155. 122 s.

Şahin, İ., Başoğlu, F. 2002. Gıda Mikrobiyolojisi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Ders notu no 89. 152 s

Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri; Üçüncü Baskı. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara. 291 s.

Temiz, A. 2003. Gıdalarda İndikatör Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş (Eds.). META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 605 s.

Topal, Ş. R. 2004. Hücre Kültür Teknikleri II. Cemturan Ofset, İstanbul, 190 s.

Tunail, N. 2000. Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Tunail, N., Halkman, A.K. (–). Gıda Mikrobiyoloji II Ders Notları. Ank. Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara. Basılmamış ders notu.

Tunail, N., Köşker, Ö. 1989. Süt Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no 1116. 138 s.

Turantaş, F. 2003. Mikrobiyolojik Kriterler. Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş (Eds.). META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 605 s.

Turantaş, F. ve Ünlütürk, A. 2003. Hızlı Mikrobiyolojik Yöntemler Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş (Eds.). META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 605 s.

Tükel, Ç., Çakır, İ., Doğan, H.B. 2000. Lipolitik Bakteriler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Tükel, Ç., Doğan, H.B. 2000. *Staphylococcus aureus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Tükel, Ç., Doğan, H.B. 2000. *Yersinia enterocolitica*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Ünlütürk, A. 2003. Mikrobiyal Gelişmenin İnhibisyonu. Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş (Eds.). META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 605 s.

Ünlütürk, A., Karapınar, M. Turantaş, F. 2003. Gıdalarda Önemli Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş (Eds.). META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 605 s.

Ünlütürk, A., Turantaş, F. 2003. Mikroorganizma Gıda İlişkileri. Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş (Eds.). META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 605 s.

İndeks; Genel

<i>Aeromonas</i> Türleri	213	Hareket Testi (Asılı Damla)	254
Agar	22	Hareket Testi (Besiyerinde)	251
<i>Alicyclobacillus</i>	217	Hazırlanmış Besiyeri Depolaması	49
Anaerob Bakteri Sayımı	139	Hemoliz Testi	252
Anaeroblar	223	Hidrojen Sülfür Oluşumu	250
Antibiyotikler	28	Homojenizasyon	79
Ayırt Edici Besiyerleri	32	Homojenizasyon Çözeltileri	81
<i>Bacillus cereus</i>	205	Homojenizatörler	81
Basit Boyama	253	Howard Lamı	116
Besiyerleri	9	Isıtarak Sterilizasyon	64
Beyin ve Kalp Ekstraktı	21	Işınlama ile Sterilizasyon	68
Biyolojik Stabilité Testi	121	İdentifikasyon Besiyerleri	34
Breed Yöntemi	115	İdentifikasyon Esaslı Sayım	98
Cam Malzeme	38	İnaktivatörler	28
<i>Campylobacter</i>	215	İndirgeyiciler	29
Canlandırma	118	İndol Testi	243
<i>Clostridium</i> spp. ve <i>Cl. perfringens</i>	199	İnhibitörler	27
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	221	İnkübasyon	88
Çift Kat Ekim	17	İzolasyon ve Tanımlama Esasları	239
Çift Kuvvette Besiyeri	16	İzolasyonda 1:100 Oranı	241
Çözeltilerin Depolanması	48	Karbohidrat Testleri	248
Çözeltilerin Hazırlanması	51	Karbohidratlar	23
D Değeri	70	Katalaz Testi	245
DEFT Yöntemi	118	Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler	89
Dehidre Besiyeri Depolanması	47	Katkıların Depolanması	49
Depolama	47	Katkıların İlavesi	42
Diferansiyel Besiyerleri	32	Kimyasal Madde ile Sterilizasyon	66
Direk Epifloresan Filtre Tekniğı	118	Koagülaz Testi	252
Dökme Yöntemi	94	Koliform Grup Bakteriler	141
Drigalski Spatülü	90	Koloni Sayısının Hesaplanması	95
Durham tüpü	17	Kombine Besiyeri	34
Ekim	85	Kuru Sıcak Uygulaması	65
Ekim için Seyrelti Seçimi	85	Kurutma	45
Ekim ve İnkübasyon	85	Kültür Koleksiyonu ve Otokontrol	127
En Muhtemel Sayı Yöntemi	100	Laboratuvar Kuralları	5
Enterokoklar	203	Laktobasiller	233
<i>Escherichia coli</i>	155	Lipolitik Bakteriler	227
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 Serotipi	167	Lisin Dekarboksilaz Testi	250
Et Ekstraktı	21	<i>Listeria monocytogenes</i>	193
Fekal Koliform Bakteriler	151	Malt Ekstraktı	21
Gaz Oluşturma Testleri	249	Maya Ekstraktı	21
Genel Besiyerleri	30	Maya-Küf	175
Gram Boyama	254	Membran Filtrasyon	66
Halofil Bakteri Sayımı	140	Metabolizmaya Dayalı Analizler	113

Metil Red Testi	246	Sporlu Bakteri Sayımı	138
Mezofil Aerob Bakteri Sayımı	135	<i>Staphylococcus aureus</i>	181
Mikroskopik Sayımlar	115	Sterilizasyon	57
Mikroskopik Tanımlama	253	Sterilizasyon Kontrolü	69
MUG	26	Sterilize Edilmeyen Çözeltiler	70
MUP	26	Stimülatörler	29
n c M m Kavramı	75	Stok Takibi	131
Nemli Sıcak Uygulaması	59	Su (Besiyerinde)	18
Oksidaz Testi	246	Tampon Maddeler	24
Otoklavda Sterilizasyon	60	Tartım ve Eritme	38
Ox Bile	28	Tehlikeli Maddeler	55
Örneğin Açılması	77	Termofil Bakteri Sayımı	137
Örneğin Laboratuvara Getirilmesi	76	Thoma Lamı	117
Örnek Alma	73	Tindelizasyon	65
Örnek Miktarı	73	Titre Belirlenmesi	112
Peptonlar	19	Toplam Bakteri	135
Petri Kutularına Döküm	44	Toplam Enterobacteriaceae	171
pH Ayarlama	41	Tuz	23
pH İndikatörleri	25	Urease Testi	252
Proteolitik Bakteriler	229	Var/Yok Testleri	120
<i>Pseudomonas</i>	237	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	211
Psikrofil Bakteri Sayımı	136	Voges Proskauer (VP) Testi	247
Redoks İndikatörleri	26	Yatık Agar	16
Rop Sporu	231	Yayma Yöntemi	94
Roux şişesi	16	Yeniden Eritme	46
Saf Kültür Tekniği	240	<i>Yersinia enterocolitica</i>	209
Safra Tuzları	28	Yıkama	125
<i>Salmonella</i>	187	Yüzey ve Hava Kontrolü	122
Selektif Besiyerleri	31	Z Değeri	70
Seyreltme Çözeltileri	81	Zenginleştirme Besiyerleri	33
Sitrat Testi	248		

İndeks; Besiyerleri

%0,1 Peptonlu Su	256
%2 Sodyum Sitrat Çözeltisi	256
%20 Glikoz Çözeltisi	255
%35 Glikoz Çözeltisi	256
%50 Glikoz Broth	279
%50 Glikoz Çözeltisi	256
A-1 Broth	267
Alkali Pepton Besiyeri	260
Anaerobik İnkübasyon Sistemleri	312
Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi	257
Anaerocult Sistemi	314
Bacillus cereus Selective Supplement	303
Bactident Coagulase	283
Bactident E. coli	269
Baird–Parker Agar Base	282
BAT Agar	311
Bolton Broth Selective Supplement	308
Bolton Selective Enrichment Broth Base	308
Brain Heart Agar	258
Brain Heart Broth	258
Brilliant Green Bile (BGB) Broth	263
Brilliant Green Bile (BGB) Broth; Fluorocult (+MUG)	272
Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar	288
Bryant and Burkey Medium	311
Buffered Listeria Enrichment Broth acc to FDA	296
Calcium Caseinate Agar	319
Campylobacter Blood free Selective Agar (CCDA) Base; modified	309
Campylobacter Selective Agar	309
Campylobacter Selective Supplement	309
CASO (Tryptic Soy) Agar	257
CASO (Tryptic Soy) Broth	257
CASO Broth + Ampicillin	306
CASO Broth + Polymyxin B Sulfate	304
CAYE Broth Base	275
CAYE Broth Supplement	276
CCDA (Charcaol Cefoperazone Deoxycholate Agar) Base, modified	309
CCDA Selective Supplement	310
Cefixime–Tellurite Supplement (SMAC Agar Katkısı)	274
Cereus Selective Agar acc to Mossel	302
Cetrimide Agar	322
Charcaol Cefoperazone Deoxycholate Agar (CCDA) Base, modified	309
Chromocult Coliform Agar	265
Chromocult Coliform Agar (Enhanced Selectivity) ES	265
Chromocult Enterococci Broth	301
Chromocult TBX Agar	270

CIN (Yersinia Selective) Agar Base	304
CIN (Yersinia Selective) Agar Supplement	304
CT–SMAC Agar	274
Dextrose Casein–Peptone Agar	319
DG–18 (Dichloran Glycerol Agar) Agar	279
Diasalm Medium	290
Dichloran Glycerol Agar (DG–18) Agar	279
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar	280
Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM)	300
DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) Agar	280
DRCM (Differential Reinforced Clostridial Broth)	300
Duopath Verotoxins	276
EC Broth	267
Egg Yolk–Tellurite Emülsiyonu	283
Egg–yolk Emulsion	303
Enterobacteriaceae Enrichment (EE) Broth	277
Envirocheck Contact C	266
Fluid Thioglycollate Medium	316
Fluorocult Brilliant Green Bile (BGB) Broth	272
Fluorocult LMX Broth	271
Fluorocult LST Broth	271
Fluorocult VRB Agar	268
Fraser Listeria Selective Enrichment Broth Base	293
Fraser Listeria Supplement	294
Giolitti–Cantoni Broth Base	283
Gliserin–Tuz Çözültisi	299
Glutamate Starch Phenol red (GSP) Agar	306
Glycerol %87	322
GSP (Glutamate Starch Phenol red) Agar	306
İndol (Tryptone) Besiyeri	261
Kanlı Agar	259
Katı Parafin	312
Kovacs' İndol Çözültisi	271
Lactose TTC Agar with Tergitol 7	264
LEB (Listeria Enrichment Broth) acc. to FDA/IDF	297
Listeria Enrichment Broth (LEB) acc. to FDA/IDF	297
Listeria Selective Enrichment Supplement; FDA/BAM 1995, IDF/FIL	297
LMX Broth; Fluorocult (+MUG)	271
LST Broth	263
LST Broth; Fluorocult (+MUG)	271
Lysine Iron Agar	292
m-Aeromonas Selective Agar Base	307
m-Aeromonas Selective Supplement	307
Maximum Recovery Diluent	255
mEC Broth	273
Membran–Filter Enterococcus Selective Agar acc. to ; Slanetz and Bartley	301
Modified Semi solid Rappaport Vasiliadis (MSRV) Medium	290

MRS Agar	320
MRS Broth	321
MSRV (Modified Semi solid Rappaport Vasiliadis) Medium	290
mTS Broth	273
MYP Agar	302
Nutrient Broth	320
OGYE (Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract) Agar Base	281
Oxford Listeria Selective Agar	295
Oxford Listeria Selective Supplement	296
Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract (OGYE) Agar Base	281
Ozmoofil Maya Besiyeri	279
Ozmotolerant Maya Besiyeri	280
PALCAM Agar	294
PALCAM Agar Selective Supplement	295
Phenol Red Broth Base	258
Plate Count Agar	261
Plate Count Skim Milk Agar	261
Potasyum tellurit trihidrat	284
Potato Dextrose Agar	281
Pseudomonas Selective Agar Base	322
Rambach Agar	287
Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth	286
RBC (Rose Bengal Chloramphenicol) Agar	278
ReadyCult Coliforms	264
ReadyCult Enterococci	301
Reinforced Clostridial Agar	317
Reinforced Clostridial Medium	318
Ringer Çözeltisi; ¼ Kuvvetinde	255
Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar	278
RVS (Rappaport Vassiliadis Soy) Broth	286
Sabouraud %2 Dextrose Broth	280
Salmonella–Shigella Agar with Sodium Deoxycholate and Calcium Chloride (SSDC)	305
Salmosyst Broth	285
Salmosyst Selective Supplement	286
Selenite Cystine Broth	286
Sıvı Parafin	318
Singlepath Campylobacter	310
Singlepath E. coli O157 Test Kiti	275
Singlepath Listeria	298
Singlepath Salmonella	292
Skim Milk Powder (Yağsız süt tozu)	259
SMAC Agar	274
SMAC Agar CT Katkısı	274
SSDC (Salmonella–Shigella Agar with Sodium Deoxycholate and Calcium Chloride)	305
Sterikon; Biyolojik Sterilizasyon İndikatörü	260
Su Agar	260
Sulfite Iron Agar Base	300

Tamponlanmış Peptonlu Su	285
TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) Agar	305
Thioglycollate Broth	317
Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar	305
Tributyrin Agar	318
Triple Sugar Iron Agar	289
Tryptone (İndol) Besiyeri	261
Tryptic Soy (CASO) Agar	257
Tryptic Soy (CASO) Broth	257
Tryptone Soya Yeast Extract (TSYE) Agar	296
Tryptone Water	270
Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar	298
TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) Agar	298
TSC Agar Katkısı	299
TSYE (Tryptone Soya Yeast Extract) Agar	296
Tyrobutyricum Broth Base	312
Urea Broth	291
UV El Lambası	269
VRB (VRBL) Agar	262
VRB Agar; Fluorocult (+MUG)	268
VRBD Agar	276
XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) Agar	288
XLT4 Agar	289
Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar	288
Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar	278
Yersinia Selective (CIN) Agar Base	304
Yersinia Selective (CIN) Agar Supplement	304
YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) Agar	278
Yumurta Sarısı Emülsiyonu	303
Yumurta Sarısı–Tellurit Emülsiyonu	283

Sevgiyle, bilgiyle

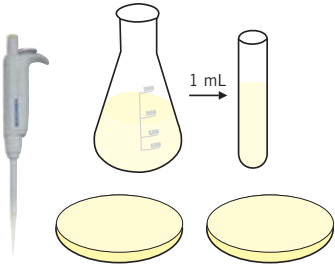
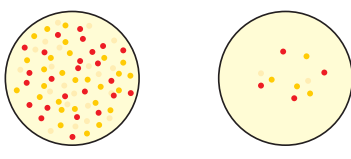
www.mikrobiyoloji.org

www.kimyaevi.org

www.orlab.com.tr

Ek A - 01

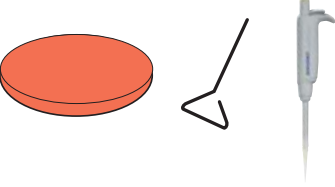
Toplam Mezofil Aerob Bakteri Sayımı

	10 g (mL) gıda, 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Gerekli seyreltmeler yapılır. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir. PCA (Merck 1.05463) besiyerine ekim yapılır.
	Petri kutuları amaca göre 28 °C ya da 37 °C'da 48 saat inkübasyona bırakılır.
	İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılır, gıdadaki toplam mezofil aerob bakteri sayısı hesaplanır.
	Petri kutuları otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

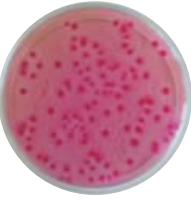
Ek A - 02

Koliform Bakterilerin Sayılması; Katı Besiyeri (ISO 4832)

	10 g (mL) gıda, 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.
---	--

	VRB Agar (Merck 1.01406) besiyerine ekim yapıp, ikinci kat VRB ilave edilir.
---	--

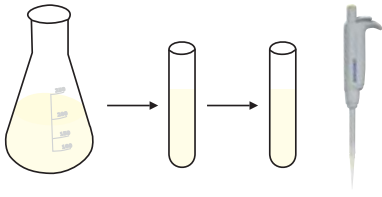
	Petri kutuları 30-32 °C ya da 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.
---	--

	1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili koyu kırmızı koloniler sayılır.
---	---

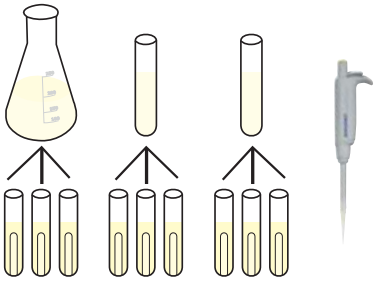
	Sterilizasyondan sonra petri kutuları yıkanır/atılır.
---	---

Ek A - 03

Koliform Bakterilerin Sayılması; EMS Yöntemi (ISO 7725)



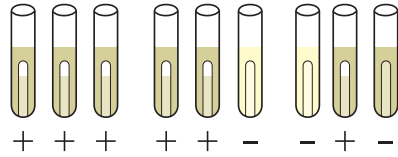
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. 10^{-2} ve katı gıdalarda 10^{-3} seyreltiler hazırlanır.



İçlerinde Durham tüpü bulunan LST Broth (Merck 1.10266) besiyerinden; katı gıdalarda 10^{-1} ; 10^{-2} ve 10^{-3} , sıvı gıdalardan 10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden olmak üzere 3'er tüpe 1'er mL ekim yapılır.



Tüpler 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirilir. EMS tablosu kullanılarak gıdadaki koliform grup bakteri sayısı hesaplanır.



Sterilizasyondan sonra tüpler yıkanır.

100 mL Suda Koliform Bakteri ve E.coli Aranması



100 mL su örneği steril bir kaba alınır.



+



Üzerine 1 poşet Readycult Coliforms (Merck 1.01298) ilave edilir.



Çalkalanıp, 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Besiyeri renginin yeşile dönüşmesi koliform pozitif olarak değerlendirilir.



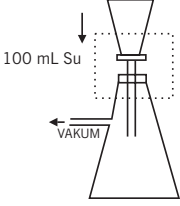
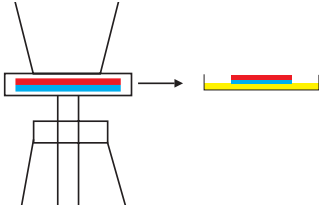
Koliform pozitif olan örnek, loş bir yerde kısa dalga boylu UV lambası (Merck 1.13203) ile incelenir. Bunlardan floresan ışık verenler *E. coli* olarak değerlendirilir.



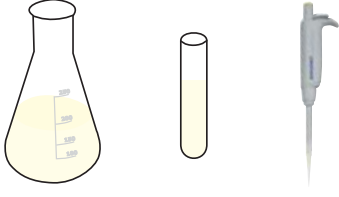
Sterilizasyondan sonra kullanılmış malzeme yıkanır.

Ek A - 05

Membran Filtrasyon Yöntemiyle Sularda Koliform Bakteri Aranması

	100 mL su, membran filtrasyon sisteminden geçirilir, filtre Lactose TTC Agar with Tergitol 7 (Merck 1.07680) üzerine yerleştirilir.
	Filtrenin, bakterilerin tutulmuş olduğu üst kısmı Petri kutusuna yerleştirmede yine yukarıda olmalıdır.
	Petri kutusu tabanı üzerinde olacak şekilde 30-32 °C ya da 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.
	Sarı-portakal renkli koloniler koliform grup bakteri olarak değerlendirilir ve su örneğindeki koliform grup bakteri sayısı hesaplanır.

***E. coli* Sayılması; Katı Besiyeri**

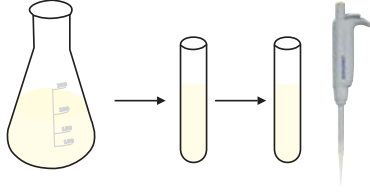
	10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.
---	--

	Fluorocult VRB Agar'a (Merck 1.01406) ya da Chromocult Coliform Agar'a (Merck 1.10426) ya da Chromocult TBX Agar'a (Merck 1.16122) ekim yapılır. VRB Agar ekiminde ikinci kat VRB Agar ilave edilir.
---	--

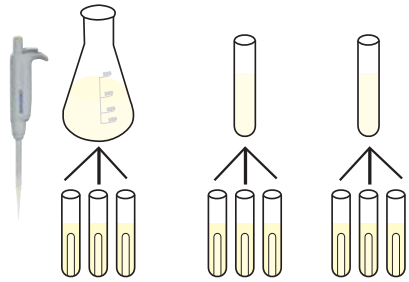
	Her ikisi de 35-37 °C'da olmak üzere Fluorocult VRB Agar 18 saat ve Chromocult Coliform Agar 24 saat inkübasyona bırakılır. Chromocult TBX Agar ise 44 °C'da 18-24 saat inkübe edilir.
---	--

U.V. 	Fluorocult VRB Agar'da 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili koyu kırmızı ve kısa dalga boylu UV lamba (Merck 1.13203) ile loş bir yerde floresan veren koloniler, Chromocult Coliform Agar'da 1-2 mm çaplı mavi-menekşe koloniler, Chromocult TBX Agar'da mavi-yeşil koloniler sayılır ve gıdadaki <i>E. coli</i> sayısı hesaplanır.
--	---

	Sterilizasyondan sonra petri kutuları yıkanır/atılır.
---	---

***E. coli* Sayılması; Hızlı EMS Yöntemi**

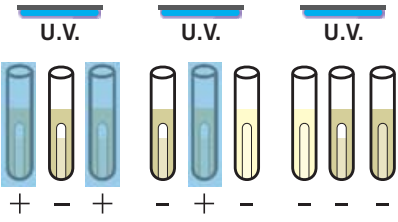
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. 10^{-2} ve katı gıdalarda 10^{-3} seyreltiler hazırlanır.



İçlerinde Durham tüpü bulunan Fluorocult LST Broth (Merck 1.12588) besiyerinden; katı gıdalarda 10^{-1} ; 10^{-2} ve 10^{-3} , sıvı gıdalardan 10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden olmak üzere 3'er tüpe 1'er mL ekim yapılır.



Tüpler $35-37^{\circ}\text{C}$ 'da 24 saat inkübasyona bırakılır.

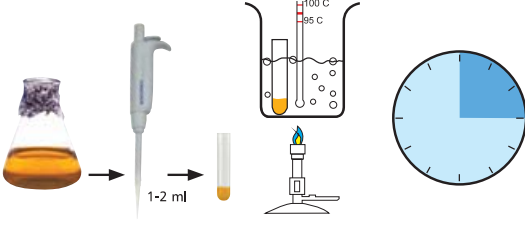
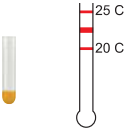
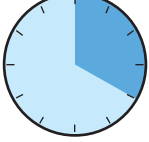


Bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşumu görülen koliform pozitif tüpler loş bir yerde kısa dalga boyulu UV lambası (Merck 1.13203) ile incelenir. Bunlardan floresan ışımaya verenler *E. coli* olarak değerlendirilir (bakınız; ek ABC). Floresan ışımadan emin olunmazsa tüplere 1 mL 1 N NaOH eklenip tekrar incelenir. EMS tablosu kullanılarak gıdadaki *E. coli* sayısı hesaplanır.

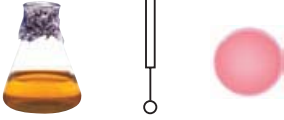
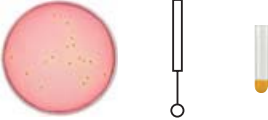
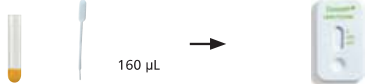
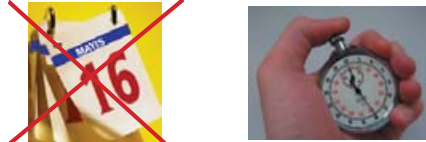


Sterilizasyondan sonra tüpler yıkanır.

Singlepath® E.coli O157 Test Kiti Uygulama Şeması

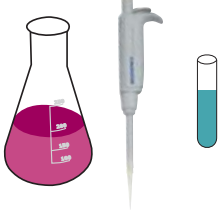
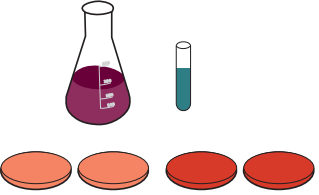
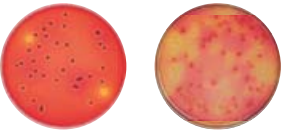
	25 g (mL) gıda 225 mL selektif zenginleştirme besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	İnkübasyon: 35–37 °C'da 18–24 saat
	Selektif zenginleştirme kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	Oda sıcaklığına getirilir.
	Singlepath E. coli O157 kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa E. coli O157 pozitif, olmazsa E. coli O157 negatif olarak değerlendirilir.
	Toplam analiz süresi 21 saat 35 dakika
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

Singlepath® Verotoxins Test Kiti Uygulama Şeması

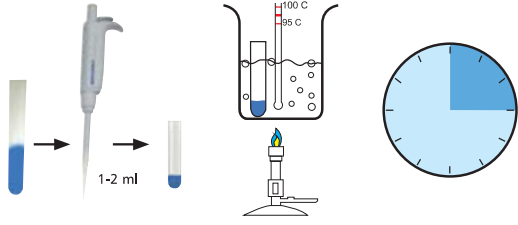
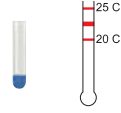
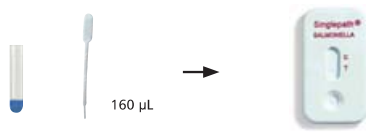
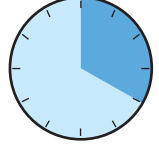
	25 g gıda 225 mL mTSB ya da mEC Broth besiyerine ilave edilir. Süt ürünleri için mTSB Broth, et ürünleri için mEC Broth kullanılmalıdır. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	mEC Broth 42°C 'da, mTSB Broth 35–37 °C'da 18–24 saat inkübe edilir.
	Selektif zenginleştirme kültüründen CT–SMAC Agar besiyerine tek koloniler düşecek şekilde sürme ya da yayma yapılır.
	CT–SMAC Agar 35–37 °C'da 18–24 saat inkübe edilir.
	CT–SMAC Agar besiyerinden tipik birkaç koloni 1 mL Caye Broth + Carbadox besiyerine inoküle edilir.
	37 °C'da 6 saat inkübe edilir.
	Bu kültürden Eppendorf tüpüne 180 µL alınır, üzerine 20 µL polimiksin çözeltisi ilave edilir.
	35–37 °C 'da 10 dakika inkübe edilir.
	Duopath Verotoksins kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir.
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (VT1) ve/veya (VT2) şeridi kırmızı olursa bu verotoksin(ler) açısından pozitif, olmazsa negatif olarak değerlendirilir.
	Toplam analiz süresi 48 saat 35 dakika.
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

Ek A - 10

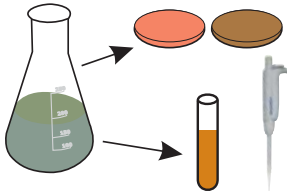
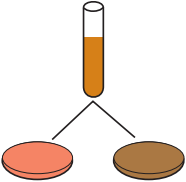
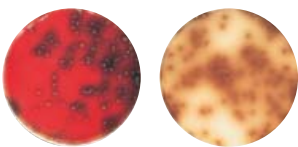
Salmonella Aranması (ISO 6579)

	25 g (mL) gıda, 225 mL TPS (Merck 1.07228) ile homojenize edilir.
	Homojenizat 35-37 °C'da 16-20 saat inkübasyona bırakılır.
	İnkübasyondan sonra Selenit Sistin (Merck 1.07709) ve RVS Broth (Merck 1.07700) selektif zenginleştirme besiyerlerine ekim yapılır. Selektif zenginleştirmede 10 mL RVS Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 0,1 mL eklenir ve inkübasyon 42-43 °C'da 24 saat olarak yapılır. SS Broth kullanımında ise 100 mL besiyerine 10 mL ön zenginleştirme kültürü ilave edilir ve 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.
	Her 2 selektif zenginleştirme kültüründen ayrı ayrı olmak üzere Brilliant Green Fenol Red (BGFRL; Merck 1.10747) Agar ile laboratuvarın tercihinin bırakılan başka bir selektif katı besiyerine sürme yapılır. Rambach Agar (Merck 1.07500), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck 1.05287) ve özellikle XLT 4 Agar (Merck 1.13919 ve Merck 1.08981) önerilmektedir.
	Petri kutuları 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.
	Tipik koloniler varsa bunlardan 5 adedi ayrı ayrı olmak üzere Triple Sugar Iron (TSI) Agar (Merck 1.03915), Urea Broth (Merck 1.08483) ve Lysine Iron Agar (Merck 1.11640) besiyerinde tanımlanır. <i>Salmonella</i> için tipik koloniler; BGFRL Agar'da etrafı parlak kırmızı bir zon ile çevrili, pembe kırmızı renkli, XLD Agar'da besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli, XLT4 Agar'da siyah renkli ve Rambach Agar'da kırmızı renklidir. Singlepath Salmonella da kullanılabilir (bakınız; ek ABC).
	Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

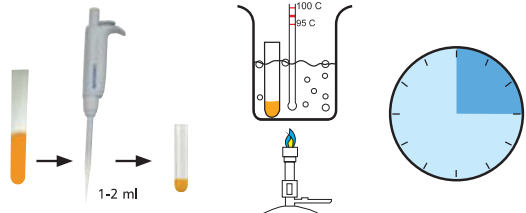
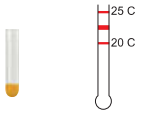
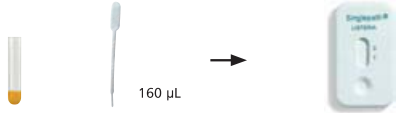
Singlepath® Salmonella Test Kiti Uygulama Şeması

	25 g (mL) gıda 225 mL TPS (Merk 1.07228) besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon
	İnkübasyon: 37 °C 'da 18±2 saat
	TPS kültüründen 0,1 mL alınıp 10 mL RVS Broth besiyerine aktarılır.
	İnkübasyon: 41,5 °C'da 24±3 saat
	RVS kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	Oda sıcaklığına getirilir.
	Singlepath Salmonella kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir.
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>Salmonella</i> pozitif, olmazsa <i>Salmonella</i> negatif olarak değerlendirilir.
	Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika.
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

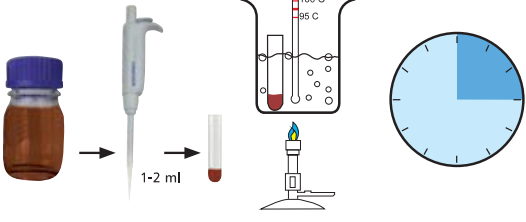
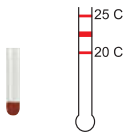
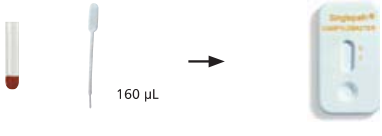
Listeria Aranması (ISO 11290)

	25 g (mL) gıda, 225 mL 1/2 Fraser Broth (Merck 1.10398 ve Merck 1.10399) ile homojenize edilir.
	Homojenizat 30 °C'da 24 saat inkübe edilir. Gıdadaki Listeria'nın hasar görmüş olduğu düşünülüyorsa selektif katkısı ilave edilmemiş Fraser Broth besiyerinde homojenize edilip, 30 °C'da 4 saat kendi halinde bırakılır. Daha sonra selektif katkı ilave edilip aynı sıcaklıkta 20 saat daha inkübe edilir.
	Bu sürenin sonunda 10 mL tam Fraser Broth besiyerine 0,1 mL inoküle edilir, paralel olarak PALCAM Agar (Merck 1.11755 ve Merck 1.12122) ile Oxford Agar (Merck 1.07004 ve Merck 1.07006) besiyerlerine öze ile sürme yapılır.
	Tam kuvvette Fraser Broth 35-37 °C'da 48 saat, PALCAM ve Oxford Agar 35-37 °C'da 24 saat inkübe edilir.
	Tam kuvvette Fraser Broth besiyerinden 24 ve 48 saatlerde aynı besiyerlerine sürme yapılır. 1/2 Fraser Broth besiyerinden yapılmış ilk Petri kutuları değerlendirilir.
	<i>Listeria</i> için tipik koloniler; PALCAM Agar'da 1,5-2 mm çapında, zeytin yeşili gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu, Oxford Agar'da ise 2-3 mm çapında, siyahımsı yeşil kahverengi, siyah zonlu, çökük merkezlidir. Tipik kolonilere hemoliz, CAMP testi, ramnoz ve ksiloz testleri yapılır, Singlepath Listeria da kullanılabilir (bakınız; ek ABC).
	Kullanılmış tüm malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

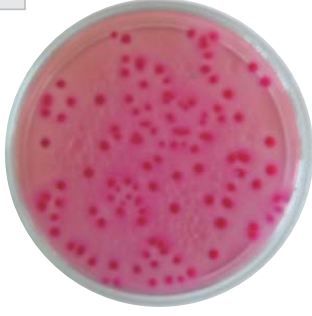
Singlepath® *Listeria* Test Kiti Uygulama Şeması

	➤ 25 g (mL) gıda 225 mL yarı selektif zenginleştirme besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	➤ İnkübasyon: 28–30 °C'da 18–24 saat
	➤ Yarı selektif zenginleştirme kültüründen 0,1 mL alınıp 9,9 mL selektif zenginleştirme besiyerine aktarılır.
	➤ İnkübasyon: 28–30 °C'da 18–24 saat
	➤ Selektif zenginleştirme kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni önce uygun bir sıvı besiyerinde 28–30 °C 'da 18–24 saat inkübe edilir ve buradan alınan 1–2 mL kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	➤ Oda sıcaklığına getirilir.
	➤ Singlepath <i>Listeria</i> kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	➤ 20 dakika beklenir.
	➤ Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>Listeria</i> pozitif, olmazsa <i>Listeria</i> negatif olarak değerlendirilir.
	➤ Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika.
	➤ Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

Singlepath® Campylobacter Test Kiti Uygulama Şeması

	25 g gıda 225 mL ya da 25 mL gıda 200 mL Bolton Broth (Merck 1.00068 ve Merk 1.00069) besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	İnkübasyon: 37 °C 'da 4 saat ve ilaveten 41,5 °C 'da 44 saat.
	Selektif zenginleştirme kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	Oda sıcaklığına getirilir.
	Singlepath Campylobacter kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>Campylobacter</i> pozitif, olmazsa <i>Campylobacter</i> negatif olarak değerlendirilir.
	Toplam analiz süresi 48 saat 35 dakika.
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

EK B - 01



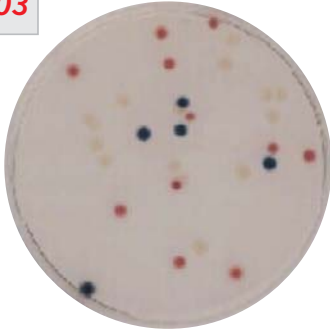
VRB Agar'da koliformlar.

EK B - 02



Brilliant Green Bile Broth'da gaz oluşumu. Solda aşılınmamış besiyeri, ortada *Proteus vulgaris* (üreme var, gaz yok) sağda *E. coli* (üreme ve gaz var).

EK B - 03



Chromocult Coliform Agar'da *E. coli* (mavi-menekşe), *Citr. freundii* (pembe-kırmızı) ve *Salmonella* (açık sarı) kolonileri.

EK B - 04



Chromocult Coliform Agar ES besiyerinde *E. coli* (mavi-menekşe), *Citr. freundii* (somon kırmızı) ve *Salmonella* (renksiz) kolonileri.

EK B - 05



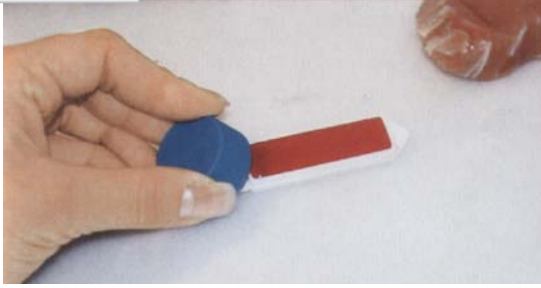
LMX Broth. Soldan sağa doğru *Salmonella*, *Salmonella*, *E. coli*, *Citr. freundii*, *Ent. cloacae*.

EK B - 06



Lactose TTC Agar'da koliformlar.

EK B - 07



Envirocheck Contact C.

EK B - 08



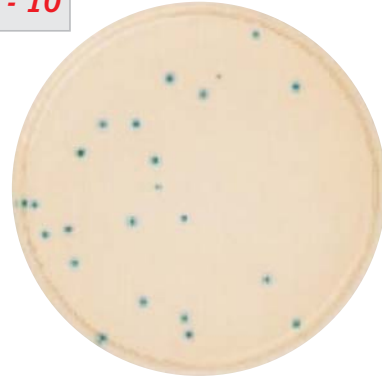
UV el lambası.

EK B - 09



Fluorocult VRB Agar'da *E. coli*.

EK B - 10



Chromocult TBX Agar, *E. coli*

EK B - 11



İndol testi. Soldaki 3 tüp pozitif.

EK B - 12



Fluorocult LST Broth'ta *E. coli*.

EK B - 13



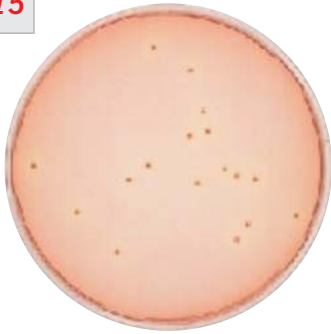
ReadyCult Coliforms'ta *E. coli*

EK B - 14



Fluorocult LMX Broth'ta *E. coli*.

EK B - 15



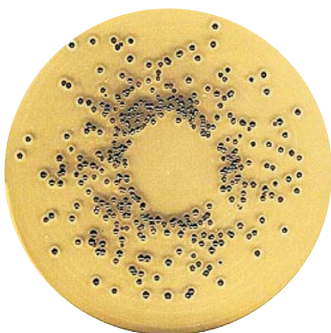
SMAC Agar'da *E. coli* O157.

EK B - 16



YGC Agar'da *Saccharomyces cerevisiae*.

EK B - 17



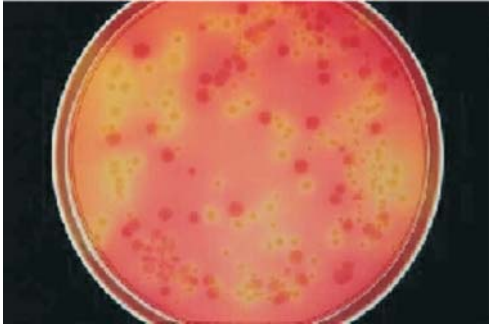
Baird-Parker Agar'da *Staphylococcus aureus*.

EK B - 18



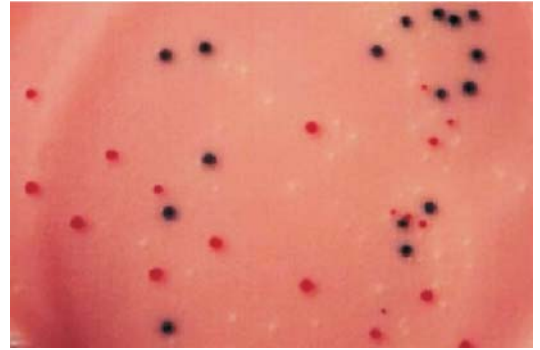
Giolitti-Cantoni Broth. Soldan sağa doğru
Pseudomonas aeruginosa,
Staphylococcus epidermidis,
Staphylococcus aureus.

EK B - 19



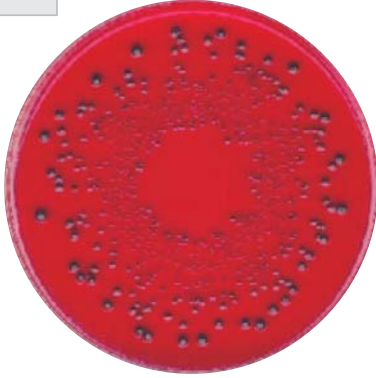
Brilliant Green Phenol Red Agar'da *Salmonella* (renksiz) ve *E. coli* (kırmızı) kolonileri.

EK B - 20



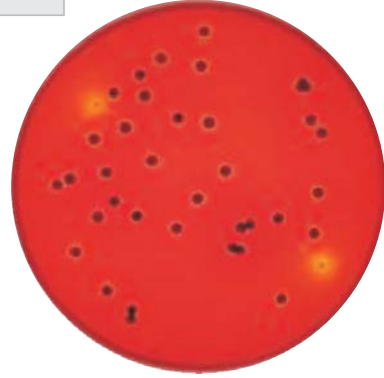
Rambach Agar'da *Salmonella* (kırmızı), *E. coli* (mavi-eşil) ve *Proteus* (sarımsı) kolonileri.

EK B - 21



XLD Agar'da *Salmonella*.

EK B - 22



XLT Agar'da *Salmonella* (siyah) ve *Citrobacter* (sarı) kolonileri.

EK B - 23



MSRV Medium'da *Salmonella*.

EK B - 24



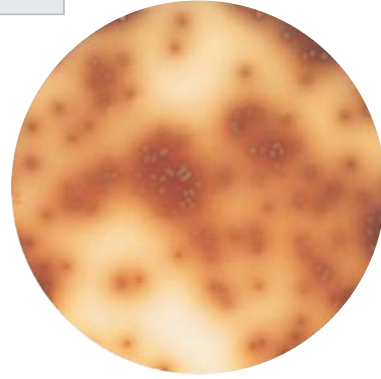
Diasalm Medium'da *Salmonella*.

EK B - 25



PALCAM Agar'da *Listeria*.

EK B - 26



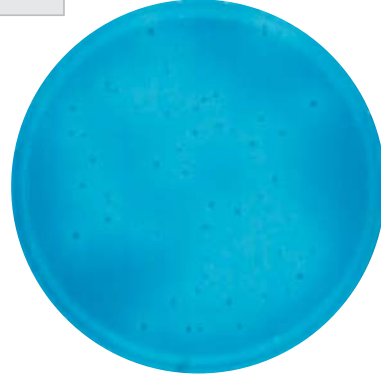
Oxford Agar'da *Listeria*.

EK B - 27



TSC Agar'da *Clostridium perfringens* (siyah), *Clostridium tetani* (renksiz) kolonileri.

EK B - 28



TSC Agar'da *Clostridium perfringens* (floresan pozitif), *Clostridium tetani* (floresan negatif) kolonileri.

EK B - 29



ReadyCult Enterococci'de pozitif sonuç.

EK B - 30



m- Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley'de *Enterococcus faecalis*.

EK B - 31



MYP Agar'da *Bacillus cereus*.

EK B - 32



CIN Agar'da *Yersinia enterocolitica*
ATCC 35669

EK B - 33



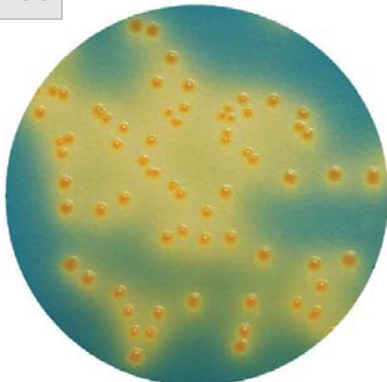
CIN Agar'da *Yersinia enterocolitica*
ATCC 9610

EK B - 34



TCBS Agar'da *Vibrio parahaemolyticus*

EK B - 35



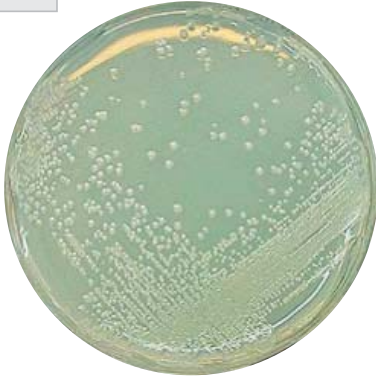
m-Aeromonas Selective Agar'da
Aeromonas.

EK B - 36



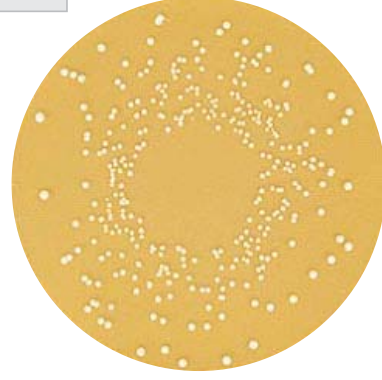
mCCDA besiyerinde *Campylobacter*
jejuni

EK B - 37



BAT Agar'da *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

EK B - 38



MRS Agar'da *Lactobacillus*.

EK B - 39



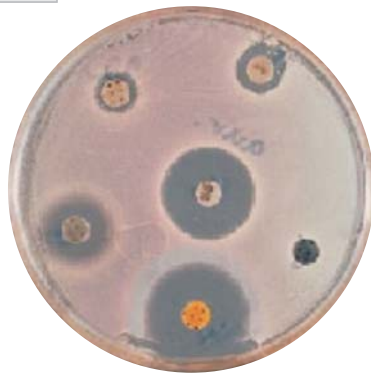
Cetrimide Agar'da *Pseudomonas aeruginosa*

EK B - 40



A1 Broth. Solda *E. coli*, sağda negatif kontrol.

EK B - 41



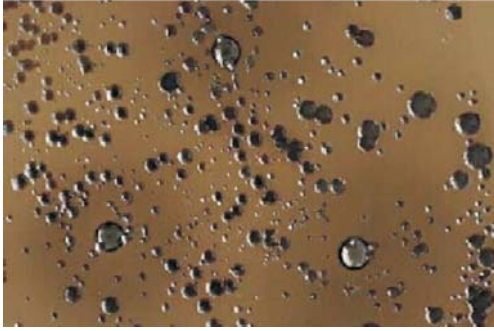
Antibiotic Sulfonamide Sensitivity-test Agar (ASS Agar).

EK B - 42



Arginine Broth acc. to schubert besiyerinde soldaki 2 tüp *Pseudomonas aeruginosa*, ortada negatif kontrol ve sağdakiler *E.coli*.

EK B - 43



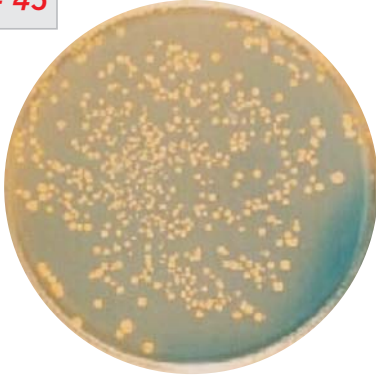
Bismuth Sulfite Agar acc. to Wilson-Blair
besiyerinde *Salmonella typhimurium*.

EK B - 44



Bolton Selective Enrichment Broth

EK B - 45



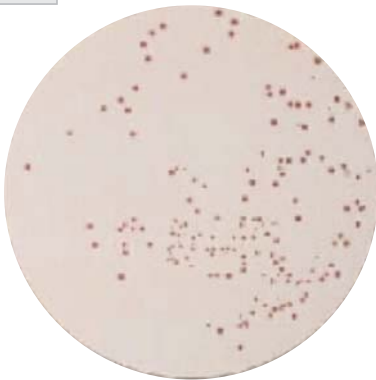
Brolacin Agar (Bromothymol-blue
Lactose Cystine Agar)'da *E. coli*.

EK B - 46



Calcium Caseinate Agar acc. to Frazier and
Rupp, modified besiyerinde büyük ve zonlu
koloniler *Bacillus cereus*, diğerleri
Staphylococcus aureus.

EK B - 47



CATC Agar (Citrate Azide Tween®
Carbonate)'da *Enterococcus faecalis*.

EK B - 48



Chapman Agar (Staphylococcus Selective
Agar No. 110 acc. to Chapman)'da
Staphylococcus aureus.

EK B - 49



CYE-Agar'da *Legionella pneumophila* spp. *fraseri*.

EK B - 50



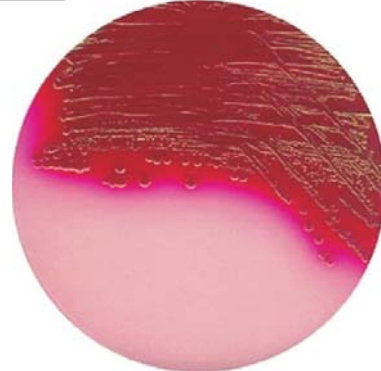
DNase Agar'da *Staphylococcus aureus*

EK B - 51



EMB Agar'da *E. coli*.

EK B - 52



Endo Agar'da *E. coli*.

EK B - 53



Lysine Iron Agar. Soldan sağa doğru
Citrobacter freundii, *Morganella morganii*,
Salmonella enteritidis, *Shigella flexneri*.

EK B - 54



Malt Extract Agar'da *Penicillium* commune.

EK B - 55



OGY Agar'da *Aspergillus niger* ve *Candida albicans*

EK B - 56



Orange Serum Agar'da *Lactobacillus plantarum*.

EK B - 57



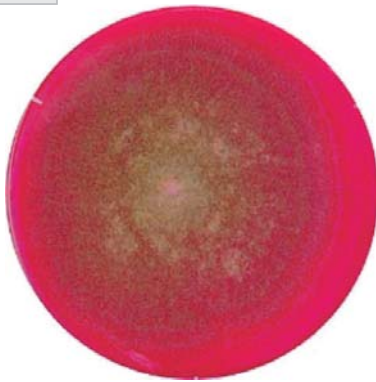
Potato Dextrose Agar'da *Saccharomyces cerevisiae*.

EK B - 58



Pseudomonas Agar F besiyerinde *Pseudomonas aeruginosa*.

EK B - 59



Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar'da *Mucor racemosus*.

EK B - 60



Sterikon biyoindikatör. Sarı-turuncu renk yetersiz sterilizasyonu gösterir.