

Membran Filtrasyon Uygulamaları¹

İbrahim ÇAKIR, Hilal B. DOĞAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

01. Genel Bilgiler
02. Filtrasyonda Enzim Uygulamaları
03. Kültürel Yöntemler
 - 03.01. Standart Membran Filtrasyon Yöntemi
 - 03.01.01. Membran Filtrasyon Seti
 - 03.01.02. Filtrasyon İşlemi
 - 03.02. Koloni Boyama Teknikleri
 - 03.03. Hidrofobik Grid Membran Filtrasyon (HGFM) Yöntemi
04. Mikroskopik Uygulamalar
 - 04.01. Basit (Direk) Mikroskopik Sayım Yöntemi
 - 04.02. Direkt Epifloresan Filtre Tekniği (DEFT)
 - 04.03. Mikrokoloni-DEFT

01. Genel Bilgiler

Gıdaların mikrobiyolojik kalitesi, gıdanın üretimi, depolanması, dağıtımı ve hazırlanması aşamalarındaki kritik kontrol noktalarının tanımlanmasına ve sağlıklı üretim koşullarının gerçekleştirilmesine bağlıdır. Özellikle üretim hattı boyunca alınan örneklerin ve son ürünün mikrobiyolojik kalitesi standartlara uygun olmalıdır.

Gıda sanayiinde kullanılan pratik mikrobiyolojik test yöntemleri az sayıda bile olsa mikroorganizmaların kantitatif tespitini sağlamalı, rutin koşullar altında basit, hızlı, doğru, tekrarlanabilir ve ekonomik olarak uygulanabilir olmalıdır. Membran filtrasyon yöntemi bu özellikleri optimal olarak sağlayan bir yöntemdir. Her ne kadar kuramsal olarak standart EMS yöntemi ile 100 ml 'de 1 'den daha az sayıda bulunmasına izin verilen mikroorganizmaların kontrolü yapılabilirse de, pratik uygulamalarda bu gibi kontroller ancak membran filtrasyon yöntemi ile yapılabilir. Membran filtrasyon yöntemi, su (içme, işletme, kullanma), meşrubat, gibi sıvı gıdaların ve suda tam olarak çözülen katı gıdaların analizinde ve özellikle gıdada aranan mikroorganizma sayısı 10 ml 'de 1 veya daha az ise uygulanabilecek hemen hemen tek yöntemdir.

Membran filtrasyonda kullanılan filtreler çok ince, çok poroz, selüloz asetat ve/veya selüloz nitrattan oluşan disklerdir. Membran filtreler 10 nm 'den 8 µm ya da daha fazla por çaplı olarak sağlanabilmektedir. Genel olarak bakteriyolojik analizlerde 0,43 - 0,47 µm por çaplı filtreler kullanılır. Az sayıda bakteri 0,2 - 0,22 µm çaplı filtrelerin kullanımını gerektirecek kadar küçüktür.

Membran filtreler sayımı kolaylaştırmak amacı ile; a) Kare şeklinde alanlar (çizgiler) basılı olarak, b) Kare şeklinde hidrofobik alanlar (çizgiler= ızgaralar) basılmış şekilde

¹ Kaynak : **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s 34. Bölüm**

hazırlanmaktadır. Bunlardan sadece kare şeklinde alanlar basılmış olanlarda (a) kolonilerin yayılması önlenemez, alanlar sadece sayım kolaylığı oluşturulmak için basılmıştır. Bir diğer deyiş ile bu alanlar kullanılmadan da sayım yapılabilmektedir ve filtre üzerinde oluşan tüm koloniler sayılır. Oysa kare şeklinde alan oluşturacak şekilde hidrofobik ızgara basılmış (b) olan filtrelerde hidrofobik ızgaralar farklı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu ızgaralar hidrofobik özellikte olduğu için ızgara üzerinde koloni gelişmesi mümkün değildir. Bu sistemde ızgara içinde kaç adet koloni olduğu değil, ızgaranın koloni varlığı açısından pozitif ya da negatif olduğu değerlendirilir. Gıda mikrobiyolojisinde bu sistem "Hydrophobic Grid Membrane Filtration = HGMF)" olarak anılmaktadır. Kavram olarak standart membran filtrelerden farklı olması nedeni ile HGMF tekniği aşağıda ayrı bir başlık altında (3.3.) incelenmiştir.

Membran filtreler sadece gıda mikrobiyolojisinde mikrobiyolojik kontrol amacı ile değil, sterilizasyon amacı ile de kullanılmaktadır. Isıl işlem uygulanamayan başta antibiyotikler ve vitaminler olmak üzere mikrobiyolojide kullanılan bazı besiyeri bileşenleri membran filtrasyon ile sterilize edilmektedir. Benzer şekilde bakteriyofaj çalışmalarında da faj izolasyonu için membran filtrelerden yararlanılmaktadır.

Yeterli deneyim kazandıktan sonra sistemin uygulanışı katı besiyeri kullanılan yöntemler ve EMS yönteminden daha kolaydır. Bu yöntemde ticari olarak pazarlanan ve besiyeri emdirilip kurutulmuş özel pedlerden oluşan steril besiyerlerinin kullanılması halinde besiyeri hazırlamaya gerek kalmaz. Bunun yanında amaca uygun olarak standart Petri kutularında hazırlanan klasik katı besiyerleri de bu uygulamada başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Membran filtrasyon yönteminde kullanılan filtreler kurutularak ve sterilize edilmiş saydam plastik, cam vb. ambalajlar içinde uzun süre korunabilir, hatta mikroorganizmaya zarar vermeden kurutulan filtreler ileri çalışmalarda kullanılmak üzere mektupla dahi başka laboratuvarlara gönderilebilir. Bu gibi üstünlükler diğer sayım ve/veya arama yöntemlerinde yoktur.

Tüm bu üstünlüklerine karşın membran filtrasyon yönteminin kullanımında bazı sınırlamalar vardır. Suda tam olarak eriyebilenlerin dışında kalan katı gıdalar ile boza ve şeftali suyu gibi pulplu sıvılar normal filtrasyon işlemi ile membran filtreden geçirilemezler. Benzer şekilde normal yağlı süt de kolaylıkla filtre edilemez. Bununla beraber, bu gibi gıdaların filtrasyonu için özel çözücüler ve/veya enzimler ve/veya ön filtre kullanımı ile membran filtrasyon yöntemi pek çok katı gıda da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Aşağıda filtrasyon aşamasında kullanılan enzimlere örnekler verilmiştir.

Gıda mikrobiyolojisinde membran filtrasyon uygulamaları temel olarak; kültürel yöntemler ve mikroskopik yöntemler olmak üzere iki ana grup altında toplanabilir. Kültürel yöntemler de kendi içinde kolonilerin gözle sayımı ve mikrokolonilerin mikroskop ile sayımı olarak ikiye ayrılabilir.

02. Filtrasyonda Enzim Uygulamaları

Membran filtrasyon uygulamalarında pratik olarak en büyük zorluk filtre edilecek materyalin filtreyi tıkamasıdır. Bu gibi durumlarda yapılması gereken tek şey sayımı yapılacak bakterilere zarar vermemek kaydı ile filtreyi tıkayabilen organik maddelerin enzimler ile filtreyi tıkayamayacak daha küçük moleküllere parçalanmasıdır. Çizelge 1 'de bu amaçla kullanılacak enzimlere örnekler verilmiştir.

Çizelge 1. Membran Filtrasyonda Kullanılan Enzimler

Gıda	Enzim	Gıda	Enzim
Yağsız süttozu	Tripsin	Kek karışımları	Amilaz
Çiğ süt	Tripsin	Meyve Püreleri	Pektinaz
Yağsız süt dışındaki diğer sıvı süt ürünleri	Tripsin	Lesitin	Lesitinaz
Dondurma ; Stabilizer kullanılmamış	Tripsin	Yumurta ; Sıvı ya da toz	Tripsin
Dondurma ; Gum içeren	Hemiselülaz	Peynir tozları ; spray dried	Selülaz ya da Proteaz
Dondurma ; selülaz türevleri içeren	Selülaz	Gumlar	Hemiselülaz
Süt ; spray dried	Tripsin	Turunçgil suları	Pektinaz
Peynirler	Tripsin	Bebek mamaları	Tripsin
Çiğ et	Tripsin	Sodyum kazeinat	Proteaz
Ekşi krema	Diastaz	Çikolata	Amilaz
Yoğurt	Tripsin	Pişmiş et	Tripsin
Tereyağı	Triton X-100	İstiridye	Tripsin
Margarin	Triton X-100	Kahvaltılık tahıllar	Selülaz

Bu enzimler tek başlarına kullanılabilecekleri gibi süt ürünlerinde olduğu gibi somatik hücreleri ve yağları parçalamak amacı ile kombine olarak da uygulanabilirler.

03. Kültürel Yöntemler

03.01. Standart Membran Filtrasyon Yöntemi

Yöntemin prensibi, belirli bir hacimdeki sıvı (ya da homojenize edilmiş katı) gıda örneğindeki mikroorganizmaları, por çapları bilinen (genellikle, bakterilerin tespiti için 0,45 µm, mayaların tespiti için 0,65 µm) bir membran filtre üzerinde tutmak, bu filtreyi aseptik koşullarda uygun bir standart katı besiyeri veya besiyeri emdirilmiş absorbant ped üzerine yerleştirerek koloni oluşmasını sağlamak ve bu kolonileri sayarak gıdadaki mikroorganizma sayısını bulmaktır.

Sayımı yapılacak mikroorganizmaya göre genel ya da selektif besiyeri kullanılabilir. Standart kültürel yöntemlerde olduğu gibi var/yok testleri için zenginleştirme kültürleri membran filtreden geçirilerek bu filtreler uygun bir selektif besiyerine yerleştirilebilir. Veya MUG içeren besiyerleri kullanılarak *E. coli* sayımı/ aranması yine bu sistem ile yapılabilir.

Bir diğ er deyiş membran filtrasyon yöntemi, kullanılacak besiyerine bağı olarak her tür mikroorganizmanın aranması veya sayılmasında kullanılabilir.

Membran, besiyerine yerleştirildikten ve inkübasyon sonucu oluşan koloniler sayıldıktan sonra örnekteki mikroorganizma sayısı hesaplanabilir. Örneğ in, 100 ml iç me suyu membrandan geçirildi ve inkübasyondan sonra 25 koloni sayıldı ise sayım sonucu 25 adet/100 ml ya da 0,25 adet/ ml olarak verilir.

Membran filtrasyon yönteminde seyreltme kavramı, katı ve sıvı besiyerinde yapılan sayımlarda uygulanan seyreltme kavramından farklıdır. Örneğ in su analizi yapılacak ise, istenilen hacimde su membrandan geçirilebilir. Membran filtrasyonda standart 5 cm çaplı filtre kullanılıyor ise bu membran üzerinde 20-200 koloni oluşacak düzeyde örnek filtre edilmelidir. Bu amaçla 3 farklı membrandan örneğ in, 1 ml; 10 ml; 100 ml sıvı filtre edilmelidir. Mikroorganizma yükü fazla ise 0,1; 0,01 ml pipetlemek hatalı sonuca neden olur. Bu gibi durumlarda standart 10^{-1} , 10^{-2} seyreltmeler yapıp bu seyreltilerden 1 'er ml alınmalıdır. Membranın ıslanmasını sağlamak için kullanılacak steril su hacmi analiz sonucunu etkilemez. İstenir ise (örneğ in iç me suyunda klor veya başka bir inhibitör varsa) analizde sahte negatif sonuç almayı önlemek için su örneğ inden sonra yeteri kadar steril su veya özel yıkama çözültisi geçirilerek (bir anlamda filtre edilerek) membran üzerinde kalabilecek inhibitörler uzaklaştırılabilir. Yine burada kullanılacak steril yıkama suyu ya da yıkama çözültisi miktarı analiz sonucunu etkilemez. Membran filtrasyon tekniğ i ile sayımın en önemli üstünlüklerinden birisi de sadece membran filtrasyon haznesine konulan sayım yapılacak sıvının miktarının önemli olması, bunun üzerine konulacak steril sıvıların miktarının önemli olmamasıdır.

Standart membran filtrasyon yöntemi ile gıdaların mikrobiyolojik analizinde dikkat edilmesi gereken bazı noktalar bulunmaktadır. Bunlar:

- Yüksek oranda yağ içeren gıdaların (peynir, sosis, çikolata, mayonez, krema, tereyağı gibi) analizinde örnek, 40-45 °C 'a ısıtılmış ve önceden sterilize edilmiş bir emülgatör ile muamele edilmelidir. Emülgatör olarak en fazla kullanılanlar Tween 80 (%0,5-1 konsantrasyonlu) ve Triton X-100 (%1-5 konsantrasyonlu) 'dür.

- Şeker ve şekerli ürünler maya, küf ve bakteri tespiti açısından analize alınmaktadır. Bu ürünler 10 veya 100 katı steril su ile karıştırılarak çözülmekte veya yaklaşık 40 °C 'da ısıtılarak çözülmeye kolaylaştırıldıktan sonra filtre edilmelidirler.

- Sebze ve baharat gibi örnekler küçük parçalara ayrılır. 40-45 °C 'da fizyolojik tuzlu suda 20 dakika kadar ısıtılıp, mikroorganizmaların sıvı faza geçmeleri sağlanmalıdır.

- Filtrenin tıkanmasına neden olacak gıdalarda ön filtrasyon işlemi uygulanmalıdır. Kullanılan ön filtrenin por çapı 12 µm kadar olabilmektedir.

03.01.01. Membran Filtrasyon Seti

Membran filtrasyon işleminde kullanılan düzenekler; vakum pompası, vakum hortumu, vakum erleni, ana gövde, filtre gövdesi ve filtrelerden oluşmaktadır. Burada kullanılan ana gövdenin otoklavda sterilizasyona dayanıklı camdan veya tercihen paslanmaz çelikten yapılmış olması gerekmektedir. Filtrelerin por çapları, filtrenin üst yüzeyinden alt tarafa doğru ilerledikçe 3-5 kat genişleyecek şekilde yapılmıştır. Bu nedenle bakteriler üst tarafta

tutulurken, besiyeri kapiller hareketle kolayca yukarıya doğru yükselebilmekte ve böylece filtre üzerinde kalan mikroorganizmaların besin maddelerini alarak gelişmeleri ve koloni oluşturmaları sağlanmaktadır. Filtreler yapıldıkları membranların cinsine göre tek kullanımlık olabildikleri gibi, tekrar kullanılabilir olanları da bulunmaktadır. Burada kullanılan pedler, steril dehidre besiyeri içerdikleri (Sartorius) için 3,0-3,5 ml steril demineralize su ile ıslatılıp, hemen kullanıma hazır hale getirilebilmektedir. Besiyerini rehidre hale getirmek için kullanılan steril suya, istenen maddeler ilave edilerek zenginleştirilmiş besiyeri de hazırlanabilir. Örneğin Wort agar veya orange serum agar besiyerini rehidre hale getirmek için kullanılan suya %5 etanol ilave edilmesi asetik asit bakterilerinin gelişimini teşvik etmektedir. Bir başka uygulamada ise steril pedlere ampul içinde sterilize edilmiş sıvı besiyeri ilave edilmektedir.

03.01.02. Filtrasyon İşlemi

Filtrasyon aşamaları sırasıyla:

- Filtrasyon setinin gövdesi otoklavda 121 °C 'da 15-30 dakika sterilize edildikten sonra filtre düzeneği kurulur.
- Filtre yatağı steril su ile ıslatılır. Membran filtre koruyucu diski ile birlikte filtre tutucuya yerleştirildikten sonra, koruyucu disk uzaklaştırılır.
- Belirli bir hacimdeki su veya seyreltmelerden alınan örnek ana gövdeye aktarılır.
- Vakum pompası çalıştırılarak örnek filtre edilir ve daha sonra filtre tutucunun iç kısmı steril su, fizyolojik tuzlu su veya tercihen özel yıkama çözeltisi ile yıkanarak esansiyel yağ asitleri ve dezenfektan gibi inhibitörler uzaklaştırılır. Membran filtrasyonda porlar çok küçük olduğu için sistem bir anlamda hidrofobik özellik göstermektedir. Dolayısı ile filtrenin altı ile üstü arasında üst taraf lehine bir basınç farkı olmaz ise sıvının filtreden geçmesi mümkün değildir. Dolayısı ile filtre altına vakum uygulanarak filtrasyon işlemi gerçekleştirilir.
- Steril bir pens ile aseptik koşullarda alınan filtre daha önceden Petri kutularında hazırlanmış katı besiyerleri veya 50 mm 'lik her plastik Petri kutusu için 3,0-3,5 ml steril su ilave edilerek rehidre hale getirilmiş pedler üzerine, arada hava kabarcığı kalmayacak ve filtrenin mikroorganizmaların bulunduğu kareli kısmı üste gelecek şekilde yerleştirilir.
- Petri kapakları üstte kalacak şekilde, ters çevrilmeden amaca uygun sıcaklık ve atmosfer koşullarında inkübasyona bırakılır.
- Eğer ön filtre kullanılmış ise ön filtre de benzer şekilde Petri kutusuna yerleştirilir ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda ön filtrede ve asıl filtrede oluşan koloniler sayılarak bunların toplamı analiz edilen gıdadaki mikroorganizma sayısı olarak verilir.

03.02. Koloni Boyama Teknikleri

Standart filtrasyon işlemi sonunda oluşan kolonilerin sayımı ile kob/ml-g olarak sonuç verilebilmekte ise de bazı durumlarda oluşan kolonilerin rengi ile filtre arasında yeterli kontrast sağlanamadığı için kolonilerin sağlıklı bir şekilde sayımı mümkün

olamayabilmektedir. Bu gibi durumlarda oluşan kolonilerin boyanması söz konusudur. Bu amaçla negatif boyama ile ortamın boyanıp kolonilerin renksiz kalması ya da pozitif boyama ile kolonilerin doğrudan boyanması ile sayım işlemleri kolay hale getirilebilir.

a) Negatif boyama : İnkübasyon sonrasında membran %0,01 'lik malahit yeşili ile 3 - 10 saniye muamele edilir, sonra fazla boya dezenfektan olan bir çözeltiliye dökülür. Bu boyama şeklinde membran filtre boyanıp, koloniler boyanmadan kalacağı için sayım yapılan sahada berrak kalan alanlar bakteri kolonileri olarak sayılır.

b) Pozitif boyama : Membran filtre %0,01 'lik metilen mavisi ile 5 dakika muamele edilip, membran filtre fazla boyanın akıtılması amacı ile suya konulur. Metilen mavisi bakteri kolonilerine oranla membrandan daha kolay olarak yıkanır ve böylece membran üzerindeki boyalı kısımlar bakteri kolonileri olarak sayılır.

03.03. Hidrofobik Grid Membran Filtrasyon (HGMF) Yöntemi

Bu yöntem 1974 yılında, Sharpe ve Michaud adlı araştırmacıların filtre olarak hidrofobik ızgaralı membranları geliştirmelerinden sonra kullanılmaya başlamıştır. HGMF yöntemiyle tek bir membran filtre üzerinde 10^4 bakteri kolonisi sayılabilmekte ve yöntem gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde başarı ile kullanılmaktadır. ISO-Grid hidrofobik membran filtreler üzerinde 40 X 40 olmak üzere 1600 adet küçük bölme bulunmaktadır. Bu bölmeler içine yerleşen mikroorganizmalar inkübasyondan sonra dairesel koloniler oluşturmaktadır. Filtre üzerinde bulunan hidrofobik ızgara sistemi sayesinde kolonilerin yayılarak birbirine karışması engellenmekte ve bu durum sayım kolaylığı sağlamaktadır.

HGMF yönteminde, standart membran filtrasyon yönteminde olduğu gibi gerekli ön hazırlıklar yapıldıktan sonra, gıda örneği, yüzeyinde belirli sayılarda ve belirli por çaplarına sahip hidrofobik bölme bulunan filtrelerden geçirilmekte ve bu filtreler aseptik koşullar altında uygun bir besiyerine yerleştirilerek inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda içinde mikrokoloniler gelişen hücreler (hidrofobik ızgara; alan) sayılmaktadır. Sayım gözle veya otomatik makineler ile yapılabilmektedir. Pozitif hücre sayısı aşağıdaki formülde yerine konularak hesaplandığında gıda örneğinin 1 mililitresi veya 1 gramındaki mikroorganizma sayısı bulunmakta ve sonuç "gelişme görülen bölmelerdeki en muhtemel sayı" (Most Probable Number of Growth Unit; MPNGU) olarak ifade edilmektedir.

FDA tarafından önerilen formül; $EMS = \{N \times \ln [N / (N - A)]\}$ şeklindedir. Burada 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 gerekmektedir. Bu sınırların dışındaki sayılarda ekimin tekrarlanması önerilmektedir. Prensipte olarak gözle yapılan sayımlarda pozitif alan sayısı 200 'ü geçmiyor ise alanların tümünün sayılması gerekmekte, bu değeri aşan sayımlar için yatay ve düşey boyutta 4 'er olmak üzere her biri 40 alan olmak üzere toplam 8 hat boyunca sayım yapıp sonucun 5 ile çarpılması önerilmektedir.

04. Mikroskopik Uygulamalar

04.01. Basit (Direk) Mikroskopik Sayım Yöntemi

Breed yöntemi, Howard lamı gibi mikroskopik sayımlarda olduğu gibi membran filtrasyon yöntemi ile birlikte kullanılan basit mikroskopik sayımlarda da canlı ve ölü hücreler beraberce sayılırken, bu yöntemlerin en büyük üstünlüğü kısa sürede sonuç vermeleridir. Basit mikroskopik sayım, diğer deyişle direkt mikroskopik sayım (Direct Microscopic Count; DMC) yöntemi genellikle rutin kontrollerde uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemde göre örnek filtreden geçirilip mikroorganizmalar filtre üzerinde tutulduktan sonra uygun şekilde boyama ve yıkama işlemleri uygulanarak mikroskop altında sayım yapılmaktadır. Bu metod özellikle örnekte çok az sayıda mikroorganizma olduğu durumlarda uygundur.

Yöntemin uygulanmasında filtrasyon işlemi tamamlandıktan sonra filtre ana haznedan çıkartılmaz, bunun üzerine standart boyama tekniklerinde kullanılan Loeffler 'in metilen mavisi gibi bir boya filtreyi kaplayacak miktarda ilave edilir ve (Loeffler 'in metilen mavisi) örneğinde olduğu gibi 5 dakika kadar beklenir. Hangi boya kullanılırsa kullanılsın boyanın önceden filtre edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla sayım yapılacak filtre üzerine başka bir membran filtre konulması önerilir. Sonra vakum pompası tekrar çalıştırılıp boya filtre üzerinden uzaklaştırılır ve bol miktarda distile su geçirilerek membran yıkanır. Daha sonra filtre çıkartılıp kurutulur, bir Petri kutusunda bulunan immersiye yağına daldırılarak yağ ile doymun hale getirilir. Filtreler ortasından kesildikten sonra bu parçalardan mikroskopik sayıma uygun boyutta (örneğin 1 cm²) alanlar kesilip mikroskopta inceleme yapılır. Sonucun hesaplanması standart Breed yöntemine benzer. İlave olarak toplam filtrasyon alanı standart şekilde formüle ilave edilir ve filtreden geçirilen hacimdeki toplam canlı ve ölü bakteri sayısı hesaplanır. Aşağıda elma suyu konsantrisinde DMC ile yapılan sayıma ilişkin bir örnek verilmiştir.

Örnek: 10 ml konsantre filtreden rahat geçirilebilmek amacı ile 250 ml steril destile su ile karıştırılıp membran filtreden geçirilmiştir. Bu durumda 250 ml suyun hesaplamalarda hiç bir önemi olmadığı yukarıda açıklanmıştır. Burada filtreden geçirilen aslında sadece 10 ml konsantredir. Yapılan boyama işlemi sonunda filtreden 1 cm² alan kesilmiş ve farklı mikroskop görüş sahalarında ortalama 2,42 bakteri sayılmıştır. Mikroskop görüş sahası çapı standart objektif mikrometre kullanılarak 19,3 aralık yani 193 µm olarak ölçülmüştür. Buna göre standart Breed yönteminde olduğu gibi görüş sahası alanı = 29255 µm², mikroskop faktörü = 3418 ve 1 cm² alanda sayılan bakteri sayısı 3418 X 2,42= 8272 olarak hesaplanır. Bu aşamada standart Breed yönteminden farklı olarak 1 cm² alana 0,01 ml örnek aktarımı değil, filtrenin toplam alanı ve fiilen filtre edilen 10 ml örnek hesaba alınmalıdır. Her ne kadar filtrasyonda kullanılan membran filtrenin çapı 5 cm olsa bile gerçek filtrasyon alanı filtrenin değil, filtrasyonda kullanılan aparatın filtrasyonu sağlayan alanıdır. Bu alan 4,3 cm çapında ise (fiili filtrasyon alanı standart şekilde yerleştirilmiş bir filtreden her hangi bir boya çözeltisinin geçirilmesi ve daire alanının hassas bir şekilde ölçülmesi ile tam olarak ölçülmek zorundadır) fiili filtrasyon alanı 14,52 cm² olmaktadır. Bu durumda 1 cm² sayım alanından fiili sayım alanında 14,52 adet bulunmaktadır. 1 cm² alanda ortalama 8272 bakteri olduğuna göre toplam sayım alanında 14,52 X 8272= 120109 bakteri vardır. Filtrasyonda kullanılan toplam hacim 10 ml konsantre olduğuna göre konsantrinin her ml 'sindeki bakteri sayısı (canlı + ölü) 120109/10 = 12010,9 ve standart sonuç bildirim şekli ile 1,2X10⁴ adet (canlı + ölü) bakteri/ml olarak sonuç verilir.

04.02. Direkt Epifloresan Filtre Tekniği (DEFT)

Epifloresan mikroskoplar iki adet filtre ve ışık kaynağı olarak yüksek basınçlı bir cıva lambası içermektedirler. Yüksek basınçlı cıva lambaları; 366, 405 ve 435 nm 'de güçlü bir ışık yayılımı sağlamaktadırlar. Yüksek basınçlı cıva lambasından gelen ışık birinci filtreden geçerek yansıtıcıya gelir. Bir kondansör gibi görev yapan yansıtıcı optik eksene 45° 'lik açı ile ışığı objektif üzerinden preparat üzerine yansıtmaktadır. Epifloresan mikroskoplarda kullanılan bu özel yansıtıcının diğer bir özelliği preparattan yansıyan ışığı bir filtre gibi süzerek floresan ışığı geçirirken istenmeyen diğer ışınları tutmasıdır. İkinci filtre ise çok az oranda da olsa yansıtıcı tarafından tutulamayan ışınları absorbe etmek amacı ile kullanılmaktadır.

DEFT floresan boyalar ve floresan mikroskobu kullanılarak uygulanmaktadır. Yöntem orijinal olarak çiğ ve ısıl işlem görmüş süt örneklerinde bakteri sayımı için geliştirilmiş ancak daha sonra dondurulmuş balık, et, kıyma, mayonezli salatalar, krema ve krema benzeri ürünler, peynir altı suyu, domates salçası, şarap ve su gibi değişik gıdaların analizinde de yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu teknik ile elde edilen sonuçların klasik Petri sayım sonuçları ile paralellik gösterdiği belirlenmiş ve gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde hızlı arama yöntemi olarak kabul edilmektedir.

Bu yönetime göre belirli oranlarda seyreltilmiş gıda homojenizatu eğer gerekli ise süt örneğinde olduğu gibi ön filtrasyon amacı ile 5 µm 'lik naylon filtreden geçirilmekte ve elde edilen filitrat Triton X-100 ve tripsin ile 50 °C 'da muamele edilmektedir. Burada kullanılan Triton X-100 ve tripsinin görevi sütteki sırasıyla yağ globüllerini ve somatik hücreleri parçalayarak filtrenin tıkanması engellemektir. Gıdanın cinsine göre kullanılabilen farklı enzimler yukarıda Çizelge 1 'de verilmiştir. Elde edilen bu filitrat inkübasyona bırakıldıktan sonra 0,6 µm por çaplı nükleopor polikarbonat membrandan geçirilip elde edilen filtre akridin oranj ile boyanmakta ve kurutulduktan sonra boyanan hücreler epifloresan mikroskop ile sayılmaktadır. Bu yöntem direkt mikroskobik sayım yönteminden yaklaşık 100 kat daha hassastır. Son yıllarda DEFT yönteminin Howard lamı ile küf sayımına alternatif olarak kullanımı üzerine yapılan araştırmalar DEFT yönteminin diğerine göre çok daha hassas olduğunu ortaya koymuştur.

04.03. Mikrokoloni-DEFT

Mikrokoloni-DEFT yöntemi koloni oluşturabilen canlı hücrelerin sayımında kullanılan hızlı bir analiz sistemidir. Bu yönetime göre gerekli ön işlemlerden geçirilmiş gıda homojenizatu membran filtreden geçirilmekte ve uygun bir katı besiyerinin yüzeyine yerleştirilerek inkübasyona bırakılmaktadır. Mikrokolonilerin oluşması için gerekli inkübasyon süresi Gram negatif hücrelerde 3 saat, Gram pozitif hücrelerde ise 6 saattir. Daha sonra bu filtreler akridin oranj ile boyanarak oluşan mikrokoloniler mikroskop altında sayılmaktadır. Bu teknik kullanılarak 10³/g *Staphylococcus*, *Pseudomonas* veya koliform grup mikroorganizma 8 saat içinde tespit edilebilmektedir.