

06. Ekim ve İnkübasyon ¹

06.01. Ekim

06.01.01. Ekim için Seyrelti Seçimi

06.01.02. Ekim İşlemi

06.02. İnkübasyon

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 değer 10⁵ kob/g olduğu kabul edilir ise; PCA besiyerine 10⁻² seyreltiden 0,1 mL aktarılıp, inkübasyon sonunda 100 koloni sayılırsa bu değer 10⁵ 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.

¹ www.mikrobiyoloji.org ana sayfasında görülen Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları; "Anonymous, 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa." adlı kitabın 06. bölümüdür.

Basit bir yıkama dâhil 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. Prensipte olarak, öncelikle katı besiyeri kullanılmalı, daha düşük sayılarda EMS yöntemi tercih edilmeli ve EMS ile sağlıklı şekilde sonuç alınmayacak 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 beklemelerin 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, tezgâh 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 sterilité 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 sterilité 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 stretch 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 değişmelerinin 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.