

## Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi (05)

### 07. Ekim

#### A. Kadir Halkman<sup>1</sup>

##### 07.01. Giriş

Homojenizasyon ve gerekli ise ileri seyreltmeleri tamamlanmış olan örnekten; uygun analiz yöntemine göre, uygun seyrelti/ seyreltilerden uygun besiyerine/ besiyerlerine ekim yapılır.

Analiz yöntemi ile seyrelti seçiminde belirli kurallar vardır. Sayımı yapılacak mikroorganizma gruplarına göre, aynı gıdadan farklı yöntemlerle ekim yapılabilir. Var /yok analizlerindeki ekim yöntemi, sayım analizlerindeki ekim yönteminden zaten farklıdır.

##### 07.02. Analiz Yöntemi Seçimi

Mikrobiyolojide temel sayım yöntemi, katı besiyerinde yayma plaktır. Standart bir mikrobiyolojik analizde, standart boy bir Petri kutusunda inkübasyon sonrasında ideal olarak 100 koloni oluşması hedeflenir.

Yayma plak yöntemi denildiğinde; genel olarak Petri kutusuna önceden dökülmüş ve katılaşmış besiyeri üzerine 0,1 mL'nin aktarılıp yayılması anlaşılır. Bununla beraber, aşağıda açıklanacağı gibi 1 mL'nin de katı besiyerine aktarılıp yayılması mümkündür.

Buna göre katı bir gıdada, 10.000 kob/g düzeyinde hedef mikroorganizma varsa,  $10^{-1}$  seyreltiden (homojenizat) 0,1 mL yayma ekim yapıldığında, inkübasyon sonunda Petri kutusunda teorik olarak 100 koloni elde edilir. Bir diğer deyiş ile katı gıdada 0,1 mL yayma ekim çalışılabilmesi için alt sınır  $10^4$  kob/g'dir. Homojenizasyon gerektirmeyen sıvı gıdalarda doğrudan ekim ( $10^0$ ) koşulunda bu değer 1.000 kob/g-mL'dir.

Farklı uluslararası kaynaklar, Petri kutusunda sayılacak koloni sayısı hakkında farklı değerler vermektedirler. Önceleri alt ve üst değerler sırası ile 30-300 arasında iken; giderek mikroorganizma koloni boyutunun da bu değerlerde etkili kılınması, risk faktöründe çitanın yükseltilmesi ve istatistik biliminde özellikle olasılıklar ve dağılımlar konularındaki yeni yaklaşımlar sonucunda bu değerlerde değişiklik olmuştur.

---

<sup>1</sup> Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.  
Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: [halkman@eng.ankara.edu.tr](mailto:halkman@eng.ankara.edu.tr)

Kavram olarak Petri kutusundaki koloni sayısı ne kadar fazla ise istatistiksel yaklaşımla o denli doğru sonuç alınır ancak, sayımda yaşanacak zorluklar giderek artar. Petri kutusundaki sayı arttıkça buna paralel olarak koloni çapı küçülür ve bir noktadan sonra sayım mümkün olmaz. Bu durumda Petri kutusundaki yüksek sayı, bir taraftan istenmekte ama diğer taraftan istenmemektedir.

Petri kutusundaki koloni sayısı ne kadar düşük ise istatistiksel yaklaşımla o denli hatalı sonuç alınır ancak, sayımda yaşanacak kolaylıklar giderek artar. Petri kutusundaki sayı azaldıkça buna paralel olarak koloni çapı büyür ve buna paralel olarak sayım kolaylaşır. Bu durumda, Petri kutusundaki düşük sayı, bir taraftan istenmekte ama diğer taraftan istenmemektedir.

FDA tarafından süt ve süt ürünleri için kabul edilen limitler; PCA sayımlarında 25-250, VRB Agar sayımlarında 1-154 ve maya-küf sayımlarında 15-150'dir.

Standart boy Petri kutusunda ideal olarak 100 koloni değeri, sadece ekimi yapılacak seyreltinin hesaplanmasında kullanılan bir matematiksel ifadedir.

Gıdaların mikrobiyolojik kriterleri genel olarak 10 ve 10'un katları şeklinde verilir. Buna göre, ekimi yapılacak seyreltilerin seçimi yapılır. Örneğin; steril olmayan pek çok gıdada izin verilen toplam aerobik bakteri sayısı  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  kob/g şeklindedir.  $10^3$  kob/g olan gıda sıvı ise doğrudan 0,1 mL Petri kutusuna aktarıldığında ideal olarak 100 koloni gelişmesi beklenir ve elde edilecek değer koloni sayısı alt ve üst sınırları içinde olur.

Katı gıdada  $10^3$  kob/g varsa ve homojenizasyon zorunlu ise  $10^{-1}$  seyreltiden 0,1 mL aktarılacağı için Petri kutusunda teorik olarak 10 koloni gelişecektir. Bu değer, Petri kutusundaki koloni sayısı alt limitinden düşük olduğu için kullanılmaz.

Buna paralel olarak eğer katı gıdada toplam aerob mezofil bakteri sayısında yasal sınır 1000 kob/g ise,  $10^{-1}$  seyreltiden yapılacak yayma ekim sonunda elde edilecek 10'a yakın değerlerin gerçeği yansıtmama olasılığı yüksektir.

1000 kob/g yasal sınır olan bir katı gıdada eğer işletmede gerekli hijyen koşulları yeterince sağlandığı için her zaman 10'un çok altında sayım sonuçları elde ediliyorsa yayma yöntemi kullanılabilir. Burada elde edilen değerlerin, üretilmiş gıdadaki gerçek sayıyı vermeme olasılığına karşı, yasal sınırların içinde kalındığı açıktır.

Ancak; yasal sınırın 100 kob/g olduğu bir katı gıdada  $10^{-1}$  seyreltiden 0,1 mL ekim yapılarak, inkübasyon sonunda 0 ve 1 sayılarını "standart içinde kalındığı, ama 2 ve daha yukarı koloni sayılarında standardın dışına çıkıldığı" şeklindeki yorum hatalıdır.

İşletme hijyen önlemlerine değer verdiği için her zaman bu ekim sonucunda 0 değeri elde ediyorsa işletme iç denetimi açısından bu sonuç, "yasal açıdan güvenli sınır içindedir" şeklinde kabul edilebilir. 2 ve daha yüksek sayılar hakkındaki yorum doğrudur ama 1 koloni elde edilirse bunun "yasal sınır içinde" olarak kabul edilmesi mümkün değildir. Çok basit istatistik olasılık hesapları ile gerçekte 150 kob/g bakteri varsa Petri kutusunda %50 olasılıkla 1, %50 olasılıkla 2 koloni oluşacaktır.

Bu durumda sıvı gıdalarda  $10^3$  kob/mL ve katı gıdalarda  $10^4$  kob/mL, 0,1 mL aktararak yapılan yayma yöntemi için duyarlılığın kabul edilebileceği sınırlardır. Daha düşük değerlerde bu yöntemin duyarlılığı yetersizdir, Petri kutusuna 0,1 mL yerine 1 mL örnek aktarılmalıdır.

Bu aktarım 3 şekilde sağlanabilir:

- Dökme yöntemi,
- 14 cm çaplı büyük Petri kutusuna 1 mL aktarıp yayma yöntemi,
- Standart 3 Petri kutusuna 1 mL'nin paylaşılması.

Dökme yöntemi, oldukça yaygın kullanılan bir uygulamadır. Bu yöntemdeki başlıca dezavantajlar şu şekilde sıralanabilir:

- Besiyeri, gereğinden sıcak olursa mikroorganizma zarar görür,
- Besiyeri, gereğinden soğuk olursa erken jelleşme sonunda homojen bir karışım sağlanamaz.
- Bu sorunlar karşısında su banyosu kullanılması çözüm gibi düşünülürse de 45 °C'da uzun süre tutulan besiyeri zarar görür.
- Besiyerinin dökülmesinden sonra besiyeri henüz sıvı formda iken Petri kutusuna önceden ilave edilmiş 1 mL sıvı ile karıştırılması el becerisi ve alışkanlığı gerektirir.
- Toplam mezofil aerob bakteri sayımında, farklı türler besiyerinin alt ve üst katmanlarında farklı gelişme gösterebilir ve bu durum sayımda zorluğa neden olabilir.

Katı besiyerine 0,1 mL aktarılıp, yayma yapılmasının nedeni hesaplama kolaylığıdır. Ayrıca besiyerinin sıvıyı emme kapasitesi de önemlidir. Standart boy bir Petri kutusunda gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren analizlerde kullanılan besiyerlerinin tümü 0,4 mL'ye kadar olan sıvıyı emer ancak daha fazlasını ememez. Bu durumda, eğer yüzey alanı artırılırsa daha fazla sıvının emilebileceği ortaya çıkmaktadır.

Standart boy (9 cm çap) Petri kutusunun yüzey alanı  $64 \text{ cm}^2$ 'dir. Büyük boy (14 cm çap) Petri kutularında ise yüzey alanı  $154 \text{ cm}^2$  olup, 1 mL sıvıyı emebilir. Bu durumda yukarıda dökme yöntemi için verilen bütün dezavantajlar ortadan kalkmış olur. Ancak; bu boydaki Petri kutusu için yaklaşık 50 mL besiyeri gerekir, bir anlamda standart boy Petri kutusu ile çalışılırken kullanılan 4 misli fazla besiyeri kullanılmış olur.

1 mL sıvının standart boy 3 Petri kutusuna olabildiğince eşit olarak dağıtılması, uluslararası standartlara geçmiş bir uygulamadır. Analiz sonunda bu 3 Petri kutusunda gelişen koloniler "sanki tek bir yüzeye ekim yapılmış gibi" değerlendirilir ve koloni toplamı kayda geçer. Bu durumda Petri kutusundaki koloni sayısı alt değeri her bir Petri kutusu için değil, toplam için geçerlidir. Örneğin, bu şekilde yapılmış bir ekim sonunda Petri kutularındaki koloni sayıları 10; 12 ve 14 ise toplam koloni sayısı 36 olup, alt sınırın üzerindedir yani bu sayı değerlendirmeye alınır. Ancak, 3; 3; 4 şeklinde elde edilen 10 sayısı güvenilirlik sınırının altında olduğu için değerlendirmeye alınmaz. Bu yöntemde de dökme yönteminin dezavantajları yoktur ve 14 cm çaplı Petri kutusunda 4 misli yerine burada 3 misli fazla besiyeri kullanılır. Yani bir anlamda 14 cm çaplı Petri kutusuna yayma yöntemine göre daha ekonomiktir. Ancak, 1 yerine 3 Petri kutusuna örnek bilgilerinin yazılması, laboratuvarında karmaşaya yol açabilmesi gibi dezavantajları vardır.

Dökme yöntemine göre 1 mL'nin büyük Petri kutusu ya da 3 adet standart çaplı Petri kutusuna yayılması, sadece laboratuvar giderleri açısından dezavantajlı gibi görülmekle beraber, laboratuvarın, dökme sıcaklığına bağlı olarak hatalı sonuç alabilme riski de göz önüne alındığında 1 mL'nin yayılması daha doğru gibi görülmektedir.

Buna bağlı olarak 14 cm çaplı Petri kutusunda yayma ekim yapmak en akılcı yöntem olarak görülmekle ve laboratuvarlardaki uygulaması giderek artmakla beraber, uluslararası standartlara henüz bu yöntem geçmemiştir, ancak 3 Petri kutusuna yayma yöntemi uluslararası standartlarda bulunmaktadır.

Petri kutusuna 1 mL aktarılması (dökme ya da yayma) uygulamasındaki limitler sıvı gıdada 100 kob/mL ve katı gıdada 1.000 kob/g'dır. Bu koşulda ideal olarak Petri kutusunda 100 koloni elde edilir.

Kavram olarak gıdada hedeflenen ya da yasal limit bu değerlerden daha düşük ise EMS yöntemi ile analiz yapılır.

Standart 3 tüplü EMS yönteminde duyarlık, sıvı gıdalar için 0,3 EMS/mL ve katı gıdalar için 3 EMS/g'dır. Sıvı gıdalarda, ilk 3 tüpteki çift kuvvetli besiyeri üzerine 10'ar mL eklenerek yöntemin duyarlığı 0,03 EMS/mL'ye artırılabilir. Bu yöntem katı gıdalar için de uygulanabilir ama yaygın kullanımı yoktur.

Ayrıca gıdaların günlük mikrobiyolojik analizlerinde *E. coli* için <3 EMS değeri, standart EMS yöntemi ile elde edilebilmektedir.

Görüldüğü gibi gıdaların standart mikrobiyolojik analizinde hedef mikroorganizma sayısı  $10^4$  kob/g-mL ve daha yüksek ise Petri kutusuna 0,1 mL yayma,  $10^2 - 10^3$  kob/g-mL ise Petri kutusuna 1 mL aktarma (dökme ya da özel yayma teknikleri), bu değerlerin daha altında ise EMS yöntemi kullanılmaktadır. Standart 3 tüplü EMS yönteminin duyarlığı ulusal ve uluslararası kodekslerde verilen kritik limitlere uygundur.

Özellikle su analizlerinde membran filtrasyon yöntemi bir anlamda "uygulanabilecek tek yöntemdir".

### **07.03. Ekim için Seyrelti Seçimi**

Gıdaların yasal standartlara uygunluk açısından yapılan mikrobiyolojik analizinde seyreltmeye genellikle gerek yoktur. Katı gıdalarda homojenizasyon ( $10^{-1}$ ) seyreltme genellikle yeterlidir. Bununla birlikte, örneğin, çiğ süt ve süttözünde toplam aerobik mezofilik bakteri sayımında daha ileri seyreltme yapılması gereklidir.

Ekim için seyreltme seçiminde 2 farklı yaklaşım söz konusudur.

- Yasal sınırların içinde olup olmadığının kontrolü,
- Hammadde ya da ürünlerdeki gerçek mikroorganizma sayısının öğrenilmesi.

Yürürlükteki Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğine göre sade dondurmada aerobik mezofilik bakteri sayısında  $m=1 \times 10^4$  ve  $M=1 \times 10^5$  kob/g'dır.

Dondurma, katı gibi görölse de oda sıcaklığında erir ve sıvı gıda gibi çalışılır. Eridikten sonra  $10^{-1}$  seyreltisinden PCA besiyerine 0,1 mL yayma yapılır. İnkübasyon sonunda koloni sayısı 100 ve altında ise ürünün yasal sınırın içinde, 101 ve üzerinde ise yasal sınırın dışında olduğuna karar verilir. Ayrıca M değeri hakkında da bilgi edinilmesi için  $10^{-2}$  seyreltiden de yine 0,1 mL yayma yapılması gerekir. Bu durumda, yasal analiz yapan bir laboratuvar için  $10^{-1}$  ve  $10^{-2}$  seyreltmeden ekim yapmak yeterli olacaktır.  $10^{-1}$  seyreltiden yapılan ekim sonunda Petri kutusunda 10-15 gibi güvenilir sayım sonucu elde edilmesi hiç önemli değildir, 100 ve altındaki koloni sayısı elde edilmesi esastır.

Benzer şekilde  $10^{-2}$  seyreltiden yapılan ekim sonucunda Petri kutusunda 100'den fazla koloni varsa yasal kontrol laboratuvarı bunu saymak için çaba göstermeyebilir. Sayım yapılırken 101. koloniye gelindiğinde ve daha sayılacak bir o kadar daha koloni varsa sonucun  $>10^5$  kob/g olarak verilmesi yeterlidir. Kuşkusuz, yasal analizlerde kesin sayı verilerek rapor düzenlenir. Burada sonucun yasal sınırlar içinde olup olmadığının önemi vurgulanmaktadır.

Bu durumda  $m=1 \times 10^4$  ve  $M=1 \times 10^5$  kob/g olan bir gıda için katı ya da sıvı olması fark etmez, yasal denetim için  $10^{-1}$  ve  $10^{-2}$  seyreltilerden ekim yapılır.

Sade dondurma üreten kuruluş, kaliteye çok önem veriyorsa ve hep  $10^3$  kob/g düzeyinde sayım sonucu alıyorsa ekimlerin  $10^0$  seyreltiden yapılması gerekir.

Yine Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde süt tozu toplam mezofilik aerob bakteri sayısında  $m=5 \times 10^4$  ve  $M=5 \times 10^5$  kob/g'dır. Bu kez,  $10^{-1}$  ve  $10^{-2}$  seyreltiler yerine  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  seyreltilerden PCA'ya ekim yapılır ve Petri kutusunda 50 koloninin altı ya da üstü olarak değerlendirilir. Süt tozunda gerçek değer  $4 \times 10^4$  kob/g ise  $10^{-1}$  seyreltiden yapılan ekim sonucunda Petri kutusunda teorik olarak 400 koloni elde edilecektir. Bu değer, Petri kutusunda güvenilir sayım sınırının üzerindedir.

Petri kutusuna 1 mL aktarılan yöntemlerde, standartlarda izin verilen limitler zaten düşüktür. Bu durumda sıvı örneklerde  $10^0$  ve katı örneklerde ise  $10^{-1}$  seyreltilerden ekim yapılır.

EMS yönteminde sıvı gıdalarda  $10^0$  ;  $10^{-1}$  ;  $10^{-2}$  ve katı gıdalarda  $10^{-1}$  ;  $10^{-2}$  ;  $10^{-3}$  seyreltilerden yapılan ekimler, amacı karşılar.