

Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR
(Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi)
Yıl: 2008 Cilt: 06 Sayı: 1 Sayfa: 27-30
www.mikrobiyoloji.org/pdf/702080104.pdf

destek@mikrobiyoloji.org'den Seçilenler 16

Özlem Etiz Sağdaş¹

OrLab OnLine Mikrobiyoloji Dergisinde 2005 yılı 09. sayısında yayınlamaya başladığımız "destek@mikrobiyoloji.org'den Seçilenler 01" başlıklı yazımıza geçen sayımızda da devam ettik. Bu seri içinde destek masamızdan derlediklerimizi size yeni adı ile "Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR"de iletmeye devam ediyoruz.

Sevgiyle, bilgiyle

www.mikrobiyoloji.org

Enterobacteriaceae sayımı (01)

VRB Agar besiyerine 10 g/L glikoz ilave edilince *Enterobacteriaceae* sayımında kullanılabilir mi?

Teorik olarak evet. İki besiyeri arasında sadece 10 g/L laktoz ve 10 g/L glikoz farkı var. Çok basit olarak ortamda hem laktoz hem de glikoz varsa bakteri öncelikle glikozu karbon kaynağı olarak kullanır. Buna göre *Enterobacteriaceae* üyeleri glikozu kullanarak koyu kırmızı renkli koloni oluşturur.

Bu uygulamada VRB Agar besiyerindeki laktoza gereksiz yere para ödenmiş olur.

Ayrıca, yeni besiyerinde ozmotik denge değişmesine bağlı hatalı sonuç alma olasılığı var. Buna göre, rutin analizlerde *Enterobacteriaceae* için VRBD Agar kullanılmalıdır. Tartışmalı bir sonuç elde edilirse bu şekilde elde edilen sonucu savunmak kolay olmayabilir.

Enterobacteriaceae sayımı (02)

Gıda analizlerinde *Enterobacteriaceae* sayımı için VRBD Agar öneriliyor. Bu grubun tüm üyeleri glikoz pozitif midir?

Hayır. Glikoz negatif olan türler de vardır ancak rutin analizde kastedilen glikoz pozitif olanlardır. Glikoz negatif olan türler rutin analizde dikkate alınmaz.

¹ Gıda Mühendisi, www.mikrobiyoloji.org site yöneticisi. Yazışmalardan sorumlu yazar olarak E-posta adresi: mikrobiyoloji@mikrobiyoloji.org

Enterobacteriaceae sayımı (03)

Glikoz negatif *Enterobacteriaceae* üyeleri VRBD Agar besiyerinde nasıl koloni oluşturur?

Renksiz koloni oluştururlar. *Enterobacteriaceae* rutin olarak gıdalarda analiz edilir ve koyu kırmızı renkli kolonilerin değerlendirilmesi istenir. Renksiz koloniler dikkate alınmaz. Bunlar çok ender olarak görülür ve sadece akademik çalışmalara konu olabilir.

Steril Pipet Sterilitesi

Kullandığım tek kullanımlık plastik pipetin steril olmadığından endişe ediyorum. Nasıl kontrol edebilirim?

Tüpte CASO (Tryptic Soy) Broth hazırlayın. Pipetle bu besiyerini çekip geri bırakın. Dış yüzünden svapla örnek alıp bunu da CASO Broth besiyerine aktarın. 28 ve 37 °C'da 48 saat inkübasyona bırakın. Bulanma olursa pipet steril değildir. Aseptik kurallara tümüyle uymak koşulu ile alkolle dezenfekte edilmiş makas ile pipeti küçük parçalara bölüp, 1 litrelik erlen de hazırlanmış 250 mL CASO Broth besiyerine de bırakabilirsiniz. Bu yöntemde pipetin test sırasında kontamine edilme olasılığı vardır.

Suda *Salmonella* Analizi

250 mL su örneğinde *Salmonella* analizi için 2,25 L Tamponlanmış Peptonlu Su besiyeri ile mi çalışmaya başlamalıyım?

Hayır. 225 mL çift kuvvette besiyeri hazırlayıp, üzerine analiz edeceğiniz su örneğinden ilave edersiniz. Ya da su örneğini membran filtreden geçirip, 25-30 mL besiyerine bu filtreyi bırakırsınız. Her 2 koşulda da erlen hacmine dikkat edilmelidir. Membran filtre kullanılacak ise ayrıca erlen ağzının geniş olmasında yarar vardır.

***Bacillus cereus* Analizinde Katkı**

Bacillus cereus analizinde kullanılan Cereus Selektif Agar (MYP) besiyerinde 1 şişe selektif katkı 0,5 L bazal besiyeri için kullanılıyor. 100 mL besiyeri kullanıyorum. Katkıyı nasıl koruyabilirim?

Katkının üzerine tam 1,0 mL steril damıtık su ilave ettikten sonra steril Eppendorf tüplerine tam olarak 0,2'şer mL dağıtın ve dondurun. Dondurulmuş katkı, çözüldükten sonra tekrar dondurulmaz. 100 mL besi yeri için 10 mL yumurta sarısı kullanılacağına göre bu çözeltinin kontamine edilmemesi için gereken önlemlerin alınması önerilir. Her hazırlamada 0,1 mL yumurta sarısının Plate Count Agar ya da MYP Agar besiyerine yayılarak sterilite kontrolü önerilir. PCA'da her türlü kontaminasyon, MYP Agarda ise sadece bu besiyerinde gelişebilecek kontaminasyon belirlenebilir.

Yoğurtta <1 kob/g *E. coli*

Çalıştığım kuruluştaki kalite standardına göre yoğurta *E. coli* sayısının <1 kob/g olması isteniyor. Bu analiz nasıl yapılır?

Ayran olsa idi, ayranın özgül ağırlığına göre 2 mL'lik pipet kullanarak 1 mL'den biraz fazla ayran steril Petri kutusuna aktarılır ve üzerine VRB Agar+MUG gibi bir besiyeri dökülüp inkübasyona bırakılır, inkübasyon sonunda *E. coli* kolonisi görülmezse istenen standart sağlanmış olurdu. Yoğurtta bu şekilde çalışılmaz. Basit olarak 10 g yoğurdu tartın, üzerine 10 mL steril Ringer çözeltilisi ekleyerek tam olarak homojenize edin. Sonra özgül ağırlık ile hesap edilmek üzere 5 mL'lik steril pipet kullanarak 2 mL'den biraz fazla homojenizatı steril Petri kutusuna aktarın. Diğer işlemler yukarıda ayrıntı anlatıldığı gibidir.

Ayranda <1 kob/g *E. coli* (01)

Çalıştığım kuruluştaki kalite standardına göre ayranda *E. coli* sayısının <1 kob/g olması isteniyor. Bir yukarıdaki paragrafta yapılan işlem sonucuna ne kadar güvenilebilir?

Çok güvenilmez. Ayranda tam olarak 0,7 kob/g *E. coli* olduğunu varsayalım. 1'den küçük olduğu için, aslında parti kabul edilmesi gerekir. Ancak matematiksel olarak bu ekim sonunda %70 olasılıkla 1 koloni oluşacak ve parti ret edilecektir. Tersine, tam olarak 1,5 kob/g *E. coli* olduğunu varsayalım. Matematiksel olarak %50 olasılıkla 1, %50 olasılıkla 2 koloni oluşacaktır. Ancak, standart istatistiksel dağılım çerçevesinde 0 koloni oluşması da mümkündür. 10^0 seyreltiden (orijinal örnek) 1 Petri kutusuna ekim yapıldığında; Petri kutusunda inkübasyon sonunda 1 koloni elde edilirse numunedeki gerçek sayı %95 güven sınırları ile 0,96 ile 4,98 kob/g arasında olabilir. Buna karşılık aynı koşullar altında Petri kutusundaki sayı 10 olsa idi numunedeki gerçek sayı 5,72 ile 18,2 ve 100 koloni olsa idi numunedeki gerçek sayı 82,32 ile 121,52 kob/g olabilir. Görüldüğü gibi Petri kutusundaki koloni sayısı arttıkça %95 güven sınırları içinde kalmak kaydı ile numunedeki gerçek sayının dağılımı azalmaktadır. Tersine olarak sayı azaldıkça dağılım artmaktadır. Bu nedenle Petri kutusunda değerlendirmeye alınacak minimum koloni sayısı, farklı kaynaklara göre 25-30 arasındadır. (Bu değerlerin elde edildiği formül, www.mikrobiyoloji.org sitesinden bilgisayara ücretsiz olarak indirilebilecek Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları kitabının 07.01.04. bölümünde açıklanmıştır). Bu nedenle, böylesine düşük sayılarda EMS yönteminin kullanılması önerilir.

Ayranda <1 kob/g *E. coli* (02)

Bir yukarıdaki paragrafta yapılan işlemde analiz sonucuna güven artırılabilir mi?

Evet. Basit olarak 2 mL ayran örneği Petri kutusuna aktarılır ve üzerine katı besiyeri dökülür. Matematiksel olarak 1 koloni bile gelişmezse *E. coli* sayısının <0,5 kob/g olduğu varsayılır. Bu ekim sonucunda 1 koloni elde edilirse, başka bir laboratuvar da yapılan 1 mL ekimde 1 koloni elde edilme olasılığı %50'dir. Bir diğer deyiş ile aslında kalite standardı içinde yer almakla beraber partinin ret edilmesi mümkündür.

Sayım ve Var/yok Testi Kıyaslaması

Bir yukarıdaki paragrafta yapılan işlem sayım mıdır yoksa var/yok testi midir?

Mikrobiyolojik analizlerin genel ilkeleri içinde değerlendirilmesi gerekir. Yapılan işlem bir sayım yöntemidir. Var/ yok testi olarak değerlendirilmesi için; basit olarak 1 g-mL ayran alınıp, 10 mL zenginleştirme (CASO Broth gibi genel bir zenginleştirme ya da LST Broth gibi selektif bir zenginleştirme) besiyerine ekim yapıp, inkübasyon sonrasında VRB Agar + MUG besiyerine 0,1 mL yayma ve inkübasyon sonrasında tipik *E. coli* kolonisi varlığı ya da yokluğuna göre 1 g-mL ayranında *E. coli* var/yok sonucu verilir idi. Çok genel olarak var/yok testlerinde zenginleştirme uygulanır.

Selektif Olan/olmayan Zenginleştirme

Bir yukarıdaki paragrafta değinilen zenginleştirmenin genel ya da selektif besiyerinde yapılmasına nasıl karar veriliyor?

Hedef mikroorganizmanın potansiyel olarak hasar görmüş olması/olmamasına göre seçim yapılır. Eğer uygulanan çeşitli teknolojik işlemler sonucunda hedef mikroorganizmanın hasar gördüğü tahmin ediliyor ise selektif olmayan zenginleştirme uygulanmalıdır. Hammadde analizlerinde doğrudan selektif zenginleştirme uygulanabilir. Bazı standartlarda koliform/ *E. coli* analizi için LST Broth zenginleştirmesi ardından Brilliant Green Bile Broth besiyerinde ikinci bir zenginleştirme, buradan selektif katı besiyerine geçiş de vardır.