

07. Mikroorganizma Analiz Yöntemleri ¹

Prof. Dr. A. Kadir Halkman

Ankara Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

07.01. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler

- 07.01.01. Genel Bilgiler
- 07.01.02. Dökme Yöntemi
- 07.01.03. Yayma Yöntemi
- 07.01.04. Koloni Sayısının Hesaplanması
- 07.01.05. İdentifikasyon Esaslı Sayım ve Doğrulama
- 07.01.06. Sonuçların Verilmesi

07.02. En Muhtemel Sayı Yöntemi

- 07.02.01. Genel Bilgiler
- 07.02.02. EMS Yönteminin Uygulanışı
- 07.02.03. Tüplerin Değerlendirme Kuralları
- 07.02.04. EMS Yönteminde Sonuçların Verilmesi

07.03. Membran Filtrasyon

- 07.03.01. Genel Bilgiler
- 07.03.02. Membran Filtrasyon Yönteminin Uygulanışı
- 07.03.03. Membran Filtrasyon Yönteminde Sonuçların Verilişi

07.04. Titre Belirlenmesi

07.05. Metabolizmaya Dayalı Hızlı Analizler

07.06. Mikroskopik Sayımlar

- 07.06.01. Breed Yöntemi
- 07.06.02. Howard Lamı
- 07.06.03. Thoma Lamı
- 07.06.04. Direk Epifloresan Filtre Tekniği

07.07. Canlandırma

07.08. Var/Yok Testleri

07.09. Biyolojik Stabilite Testi

07.10. Yüzey ve Hava Kontrolü

07.11. Sonuçların Yorumlanması

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.

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.

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 07. bölümüdür.

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 kütlesine 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.

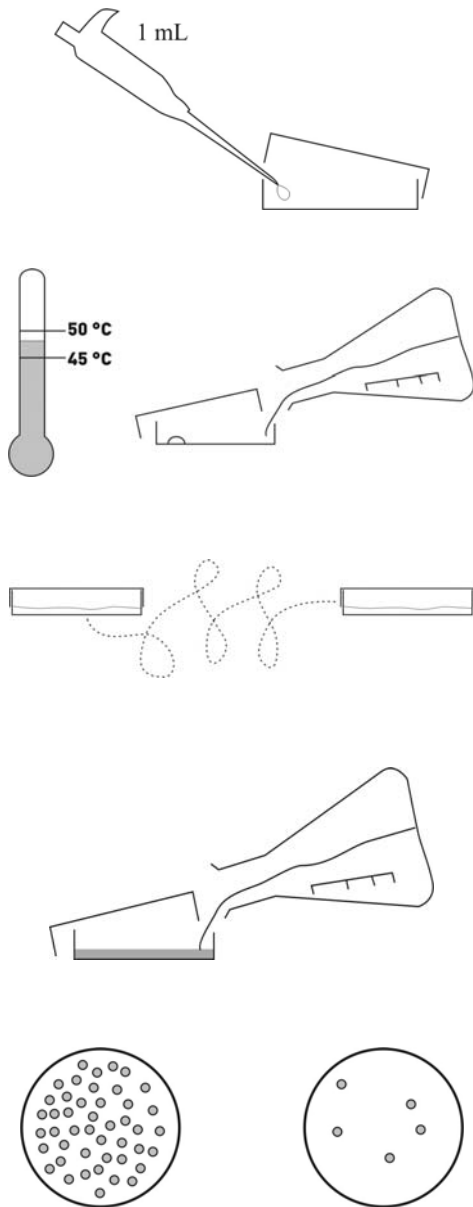
-Yaygın kullanım alanı olmamakla beraber, 10^{-1} seyreltiden 4 adet boş steril Petri kutusuna toplam 10 mL'nin dağıtılması ve üzerlerine 15'er mL kadar besiyeri dökülmesi ile fiilen 1 gram katı gıda analiz edilmiş olur.

-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 kuruması 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.

Şekil 10. Dökme Yöntemi Uygulanışı



Steril Petri kutusuna önce 1 mL örnek (sıvı gıda, homojenizatu 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.

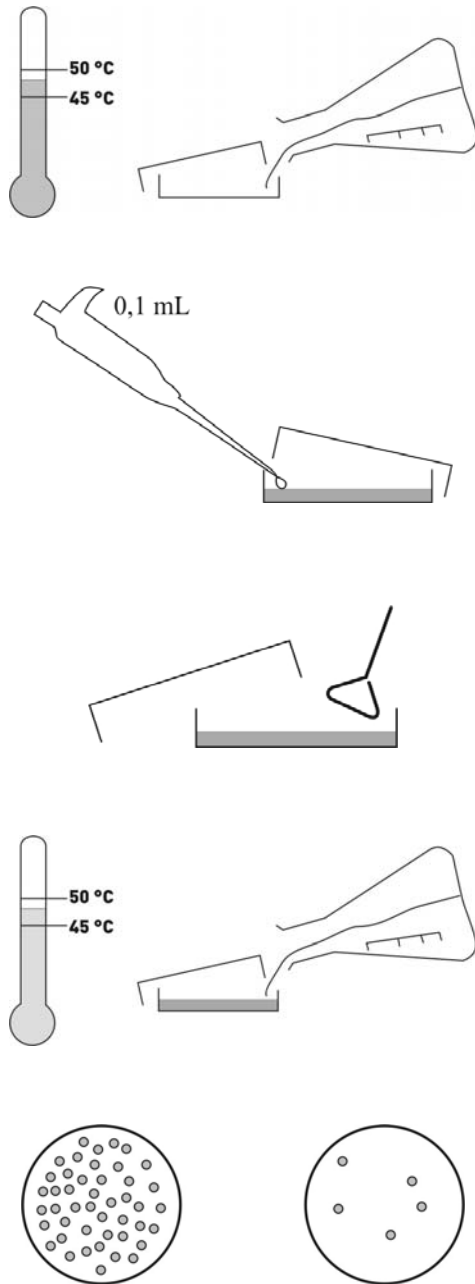
Gerekirse, 45–50 °C'da tutulan 2. kat besiyerinden 5 mL kadar dökülür ve kendi halinde jelleşmeye bırakılır. 2. kat döküm standart uygulamada yoktur, koliform grup analizi gibi bazı özel analizlerde yapılır. 2. katın da tam olarak jelleşmesi beklenir.

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.

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 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 diğer konu, 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 diğer deyiş ile 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 kırılma olma, 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 diğerk 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;

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

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

15'ten az kolonilerin sayılmama kuralı dikkate alınmadan ve yukarıdaki örneğey 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 yapılp, 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 yapılp, 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 eksiki 80 olup, bu kez kabul edilebilir sınır içindedir. Analiz yapan kişinin lehine olarak büyük değerk esas alınabileceğiy gibi, analiz sonucunun daha duyarlı olması açısından küçük değerk de dikkate alınabilir. Bu konu, ilgili talimatta belirtilmelidir.

Sayımda dikkat edilmesi gereken bir diğerk 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. Örneğın, koliformların sayımı için yaygın olarak kullanılan VRB Agar besiyerinde gelişen tipik koloniler koliform grup olarak sayıldıktan sonra bunların içinde kaç adet *E. coli* olduğuy da belirlenebilir.

Bu amaçla koliform grup bakteri kolonileri içinden koloni sayısına göre 5–20 arasında olmak üzere rasgele seçim yapılp, 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 uygulaması 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. Inkübasyon sonunda tüpler (+) ya da (-) olarak değerlendirilir.

İçinde 1.000/mL canlı hücre olan bir çözültiden 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

0^0	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 şeklidir. 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

10^0			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 laboratuvar da 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 konsantrasyon 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 10–1–0,1 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 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 (rutin) 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.

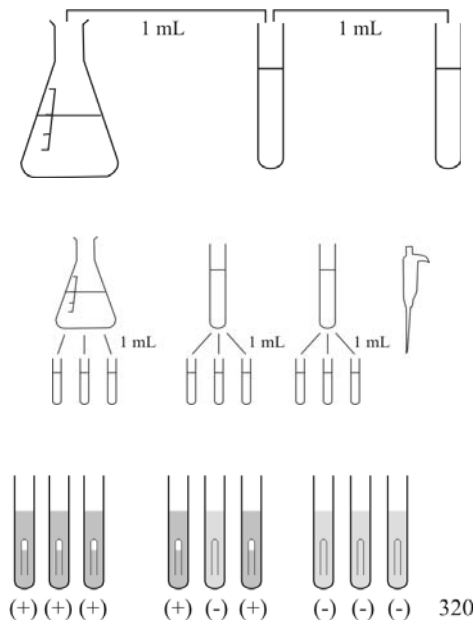
-10:90 mL şeklinde yapılan ilk seyreltme Tamponlanmış Peptonlu Su gibi bir besiyerinde yapılmış ve diğer tüplerde de besiyeri olarak yine Tamponlanmış Peptonlu Su kullanılıyor ise ilk seyreltiden steril 3 boş tüpe 10'ar mL aktarılabilir. Bu koşulda katı örnekten ilk üç tüpe doğrudan 1 gram aktarılmış 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 yapılp, 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 konsantrre 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.

-Koliiform 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 boyulu 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

0 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 10⁰ 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 (10⁰) 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 homojenizatu), 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 atmak. 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.

Kayıp 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	S e y r e l t i l e r			
	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 kalitelere 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.

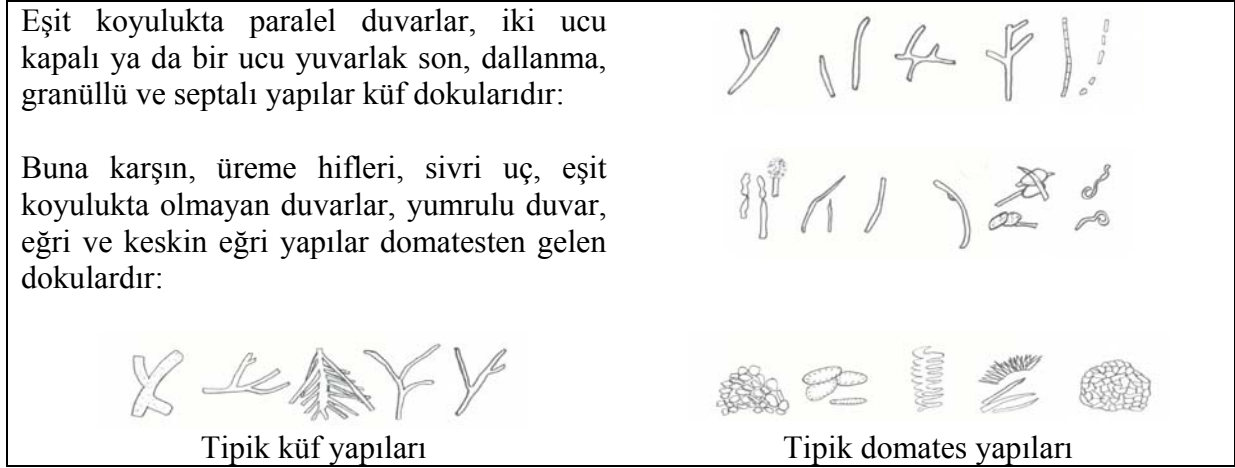
Sayım sonucu $A \times MF \times 100$ formülü ile elde edilir. Burada; A: ortalama bakteri sayısı, MF: mikroskop faktörü ve 100: 0,01 mL'yi 1 mL'ye çevirmek içindir.

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 mm³ hacim kalır. Sayım 20X ya da 40X objektif kullanılarak bu bölmede yapılır.

Thoma lamındaki 0,1 mm³ hacim; kenarları 0,05 x 0,05 mm ve derinliği 0,1 mm olan ve 20 x 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 mm³ hacimde sayılan maya, SF: yapıldı ise seyreltme faktörü ve 10.000: 0,1 mm³ 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 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 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 laminin 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 bağlı 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.

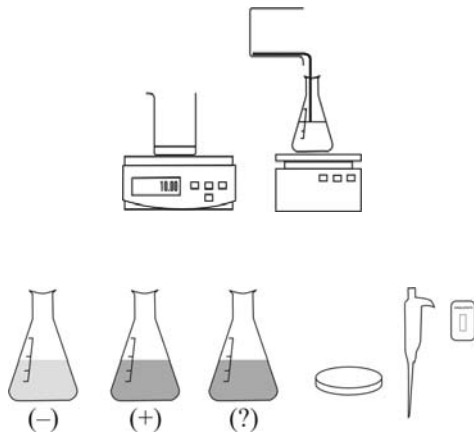
Yukarıda membran filtrasyon uygulamasında verilen son örnekte olduğu gibi amaç 100 mL su örneğinde bakteri olmaması ise, basit olarak örnek filtreden geçirilir, inkübasyon sonunda filtre üzerinde hiç koloni olmaması beklenir.

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 anlaşılar. 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 dönüşümü 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

Özelikle 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 tezgâhları, 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 tezgâhta, kasabın elinde ya da bıçağında da *E. coli* çıkması doğal karşılanmalıdır. Ancak, peynirhanede çalışan bir kişinin elinde, tezgâhlarda 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 bağlı 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 öldürülür, 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 sütte 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 çözülür, pastörize edilir ve yine genel bir besiyerine sürülür. Burada gelişme olursa koloninin sporlu bakteri ve dolayısı ile *Bacillus* olduğuna karar verilir. Ancak gelişme olmazsa bu izolatın sporlu bakteri olmadığına karar vermek yanlış olacaktır. Zayıf bir olasılık olmakla birlikte *Bacillus* türüne ait bakteriler analiz yapıldığı anda tümüyle vejetatif formda olabilir.