

Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı¹

A. Kadir HALKMAN, Hilal B. DOĞAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

01. Genel Bilgiler
02. Personel
03. Fiziki Yerleşim
04. Laboratuvar Cihazları ve Ekipman
 - 04.01. Otoklav
 - 04.02. İnkübatör
 - 04.03. Etüv (Kuru Hava Sterilizatörü)
 - 04.04. Su Destilasyonu
 - 04.05. Hassas Teraziler
 - 04.06. pH metre
 - 04.07. Karıştırıcılar
 - 04.08. Homojenizatörler
 - 04.09. Su Banyoları
 - 04.10. Aşılama Kabini
 - 04.11. Diğer Cihazlar
 - 04.12. Ekipman
05. Tipik Laboratuvar Hataları
 - 05.01. Genel Laboratuvar Hataları
 - 05.02. Örnek Hazırlanması ve Ekim Hataları
 - 05.03. Besiyerlerinin Hazırlanmasındaki Hatalar
 - 05.04. Testlerde Yapılan Hatalar
 - 05.05. Değerlendirme Hataları
06. Laboratuvarın Otokontrolü

01. Genel Bilgiler

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı, gıda hammaddelerinde, yardımcı maddelerinde, çalışma ekipmanı ve atmosferinde, ambalaj materyalinde, kullanma suyunda ve nihayet gıdada bulunabilen mikroorganizmaların arandığı ve/veya sayıldığı bir laboratuvardır.

Genel olarak yoğurt, kefir gibi fermente süt ürünleri ile boza gibi mikroorganizma gelişmesi ile elde edilen ürünler dışındaki gıdalarda mikroorganizma bulunması istenmez. Bununla beraber çoğu gıdadan mikroorganizmaları tümüyle arındırmak hemen hemen olanaksızdır. Bu durumda gıda çeşidine göre belirli mikroorganizmaların gıdalarda bulunması kaçınılmazdır. Başta gıdanın elde edildiği hammaddede doğal olarak bulunabilen, insan sağlığına zarar vermeyen ve işlem gereği tümüyle öldürülemeyen bu mikroorganizmaların belirli sayılarda gıda maddesinde bulunmasına izin verilebilir. Bu grup mikroorganizmaların yüksek sayılarda bulunması ise işletmenin gereken hijyenik çalışma kurallarına yeterince uymadığının göstergesi olarak kabul edilir ve bunlar genel kalite kriteri kapsamı içinde sayılarak gıdanın belirlenmiş mikroorganizma kalite sınırları içinde olup olmadığı kontrol edilir. Kuşkusuz, toplam mezofil aerob bakteri, maya ve küf, koliform grup bakteriler gibi genel mikroorganizmaların varlığına verilen izin öncelikle, gıdanın çeşidine daha sonra ulusal

¹ Kaynak : **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s 04. Bölüm**

standartlara ve gerek uluslararası gerek ulusal ticarete alıcı konumundaki kuruluşun kendi belirlediği standartlara bağlıdır.

Bununla beraber hiç bir gıdada patojen mikroorganizma bulunmasına izin verilmez. İnsan sağlığını doğrudan tehdit eden *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 serotipi gibi primer patojenler hangi ülkede, hangi koşulla üretilirse üretilsin ve hangi çeşit olursa olsun gıdalarda bulunmamalıdır. Bu nedenle bu gibi mikroorganizmaların gıdalarda sayılmasına gerek yoktur. Bunların sayısı analiz edilen gıdada 0 olması gerektiğine göre belirli bir miktar (genellikle 25 g ya da 25 ml) gıdada bunların varlığının araştırılması yeterlidir.

Gıdalarda bulunmasına izin verilmeyen bir başka mikroorganizma grubu ise fekal kontaminasyon indeksi olan mikroorganizmalardır. *E. coli* tip 1 gibi patojen olmadığı halde doğal bulunma yeri sıcak kanlı hayvanların bağırsakları ve dolayısı ile dışkıları olan bakteriler tüketime hazır gıdalarda bulunmamalıdır. Bu grup mikroorganizmalar patojenlerde olduğu gibi sayılmaz, sadece aranır. Ancak bunların patojenlere göre iki ayrıcalığı; daha az miktarda (genellikle 1 g ya da 1 ml) gıdada aranmaları ve gıdaların ışınlama ile korunmasına izin verilen ülkelerde belirli gıdalarda (örneğin baharatlarda) belirli sayılarda bulunmasına izin verilebilmesidir. Son gıda kodeksinde çiğ hayvansal ürünlerde de *E. coli* tip 1 bulunabilmesi gündeme gelmiştir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı, böylesine farklı mikroorganizma gruplarının varlığını araştıran ve/veya sayımını yapan, analiz sonuçlarını genellikle bir kaç gün sonra elde eden, çalışma ortamında (her ne kadar kapalı ortamda olsa da) patojenleri milyarlarca sayıda çoğaltan ve tümüyle kendine özgü bir disiplini olan bir laboratuvardır.

Bu bölümde gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı için personel, fiziki yerleşim, temel laboratuvar cihazları, hakkında bilgi verilmiş, laboratuvarda yapılabilen tipik hatalara değinilmiş ve bu hatalardan arınmak için laboratuvarın otokontrol mekanizması anlatılmıştır.

02. Personel

Mikrobiyoloji laboratuvarında mutlaka mikrobiyoloji eğitimi almış personel çalışmalıdır. Yetki ve sorumluluk düzeyi ne olursa olsun tüm mikrobiyoloji laboratuvar personelinin uyması gereken kurallar aşağıda verilmiştir. Laboratuvarında en üst düzeydeki yetkili kendisi dahil tüm laboratuvar personelinin bu kurallara tümüyle uymasından sorumlu olmalıdır.

- Mikrobiyoloji laboratuvarına laboratuvar personelinden başka hiç kimse giremez.
- Laboratuvarında hiç bir yerde (ofis masaları, soyunma dolapları ve özellikle buzdolabı) analiz örnekleri dışında tüketim amaçlı gıda maddesi kesinlikle bulunamaz.
- Laboratuvarında hiç bir şey kesinlikle yenilmez, içilmez. Bunun tek istisnası acil kullanılacak ilaçlardır (örneğin kalp rahatsızlıkları için kullanılacak dilaltı gibi ilaçlar). Personel içinde bu gibi hastalıkları olan ve acil durumda ilaç kullanması gereken kişiler var ise bu kişilerin kullanacağı ilaçlar laboratuvardaki ilk yardım dolabında tutulmalı, nasıl kullanılacağı konusunda laboratuvardaki personel bilgilendirilmeli, tercihen bu konuda tatbikat yapılmalıdır.

- Laboratuvarda çalışırken temiz bir önlük giyilmeli, bu önlük sadece laboratuvarda kullanılmalı, personelin önlük ile laboratuvar dışına çıkması (özellikle yemekhane ve hela) önlenmelidir. Önlüğün diz kapağını örtecek uzunlukta olması, kol boyunun uygun olması gerekir, önlüğün yanmaz kumaştan yapılmış olması tercih edilir. Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılacak önlüklerinin cebine kesinlikle bir şey koyulmayacağı için bu önlüklerin cepsiz olması önerilir. Tüm personelin en az 1 adet yedek temiz önlüğü bulunmalıdır.

- Personel kişisel temizliğe dikkat etmek zorundadır. Tırnaklar kısa kesilmiş olmalı, saçlar uzun ise bağlanmalıdır. Saçların bağlanması hijyen dışında bunzen beki alevinde yanma tehlikesini de azaltır. Buna karşın aynı tehlike ile saçlar asla başörtüsü ile kapatılmamalıdır. Grip, nezle benzeri hastalıklara yakalanmış personel özel koruyucu maske ile, özellikle ellerinde kesik, yara olan personel laboratuvarda eldiven ile çalışmalıdır.

- Laboratuvarda analiz sonuçlarının olumsuz yönde etkileyen çevre koşulları arasında toz önde gelen bir faktördür. Bu nedenle özellikle çamurlu ayakkabı ile laboratuvara girilmemelidir.

- Palto, mont, hırka, çanta, benzeri kişisel malzeme tercihen laboratuvar dışında bırakılmalı, laboratuvar düzeni açısından bunların laboratuvarda bulunmasında zorunluk varsa kapalı dolaplarda korunmalıdır. Laboratuvar hijiyeni açısından laboratuvarda gereksiz her türlü malzemenin bulunması önlenmelidir.

- Laboratuvarda bulunan çöp tenekeleri içine otoklavlanabilir poşetler koyulmalı, atılacak her türlü malzeme bu poşetlerde otoklavlandıktan sonra çöpe gönderilmelidir.

- Sabah işe gelindiğinde öncelikle çalışma tezgahları dezenfekte edilmeli her çalışmanın bitiminde tezgahlar tekrar dezenfekte edilmelidir. Dezenfeksiyonda ticari olarak pazarlanan pek çok dezenfektan kullanılabilir. Laboratuvara her giriş ve çıkışta özellikle eller dezenfekte edilmelidir.

- Mikroorganizma üremiş materyalin kırılması ve/veya mikroorganizma kültürünün dökülmesi durumunda karantina uygulanmalı, mikroorganizma dökülen yer ve bu yerin hemen üzerindeki hava dezenfekte edilmeli, dezenfeksiyon ve kırılmış malzemenin toplanmasında eldiven ile çalışılmalıdır. Havanın dezenfeksiyonu için aerosol etkili sistemler kullanılmalıdır. Dezenfeksiyon işlemi bittikten sonra dezenfeksiyonu yapan kişilerin eldivenleri, önlükleri sterilize edilmelidir.

03. Fiziki Yerleşim

Bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarının en önemli özellikleri arasında ayrı bir ekim odası bulunması gerektiğidir. Bu oda genel ve basit olarak ana laboratuvar bölmesinden cam ile ayrılmış bir bölme şeklinde kurulabilir. Eğer mikrobiyoloji laboratuvarı bir genel laboratuvar içinde ise böyle bir bölme olması zorunludur. Laboratuvar sadece mikrobiyoloji amaçlı kullanılıyor ise ve laboratuvarda sadece mikrobiyoloji uzmanları ve teknisyenleri çalışıyor ise ayrı bir ekim odasına gerek duyulmayabilir. Hiç bir koşulda starter kültür gibi bulunması istenilen mikroorganizmaların üretildiği laboratuvar ile istenmeyen mikroorganizmaların analizin doğası gereği çoğaltıldığı laboratuvarın aynı olması kabul edilemez. Bunlar fiziki yerleşim ve personel olarak tümüyle ayrı iki laboratuvar olmalıdır.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarının fiziki yerleşimi planlanırken dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar aşağıda özetlenmiştir.

- Tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarının ortak özelliği materyalin çalışana, çalışanın materyale zarar vermemesidir. Bu çerçevede mikrobiyoloji laboratuvarının fiziki yerleşimi önemlidir. Fiziki yerleşim materyal ve çalışan arasında karşılıklı güvenliği sağlamalı, ayrıca çalışan için rahat bir ortam yaratmalıdır.

- Duvarlar, döşeme, tezgahlar rahatlıkla temizlenebilecek şekilde düzgün olmalı, deterjan ve dezenfektanlardan etkilenmemelidir.

- Mikrobiyoloji laboratuvarının fiziki ölçüleri olarak en ideali 3 m en, 6 m boy ve 3 m yüksekliktir. 3 m en 2-3 kişinin çalışabileceği yeterli tezgah alanı sağlar. 4 m 'den fazla en laboratuvarda kullanılmayan ve genellikle gereksiz olan ekipman ile doldurulan atıl alanlar bırakır. Laboratuvar boyu olarak genelde 5- 7,5 m seçilmekte ise de en uygun olarak saptanan 6 m 'dir. Yükseklik ise çeker ocak, aşılama kabini gibi sistemler için en az 3 m 'dir. Bir başka yaklaşıma göre her çalışan için 20 m² alan gerekir.

- Laboratuvarda toz bulunmamalı, fiziki yerleşimde buna dikkat edilmelidir. Bu amaçla laboratuvar tezgahları, cihazlar, mobilyalar, vs. 'nin toz tutma yüzeyleri az olmalı, her yer rahatlıkla temizlenebilmelidir. Bu amaçla dolaplar tavana kadar yapılmalı, laboratuvar tezgahları döşmeden rahatlıkla temizlenebilecek kadar yüksekte (20 cm kadar) olmalıdır.

- Havalandırma nem ve sıcaklığı kontrol edecek, laboratuvara taze hava sağlayacak şekilde yapılmalıdır. Pencereden sağlanan doğal vantilasyon son yıllarda yerini mekanik vantilasyona bırakmıştır. Bu şekilde gerektiğinde ısıtma ve soğutma yapılabilir, basit ve ucuz önlemler ile içeriye verilen hava filtre edilerek en azından tozlanmanın önüne geçilebilir. Bu tip havalandırmalarda laboratuvara verilen basınçlı havanın uzaklaştırılması için ayrıca bir hava emme sistemine gerek vardır. Patojenler ve/veya özellikle küflerle çalışılan laboratuvarlarda dışarı atılan havanın da filtre edilmesi gerekir. Çalışma anında laboratuvar kapı ve pencereleri kapalı tutulmalı, açılabilen pencerelerde mutlaka sinek teli bulunmalıdır. Laboratuvar sıcaklığı çalışmaya uygun olmalıdır.

- Laboratuvarda yeterli sayıda elektrik prizi (monofaz ve trifaz), su musluğu ve buna bağlı olarak eviye, havagazı, ve basınçlı hava musluğu bulunmalıdır. Muslukların (su, basınçlı hava ve hava gazı) ayrıca basit açma/kapatma vanaları, prizlerin sigortaları olmalıdır. Gerektiğinde elektrik, havagazı, basınçlı hava ve suyu ivedilikle ve basit olarak kapatılabileceği önlemler alınmalıdır. Borular (su, gaz vs.) açıkta olmamalıdır.

- Laboratuvara direkt güneş ışığının girmesinden kaçınılmalıdır. Gün ışığına yakın ışık veren floresanslı lambalar tercih edilmeli, laboratuvarda yeterli aydınlanma sağlanmalıdır.

- Ekim odası ve/veya mikrobiyoloji laboratuvarında UV lambası kullanılarak havada ve ışını alabilen düzgün yüzeylerde yeterli sterilizasyon sağlanabilir. Bunun en pratik uygulaması yeterli sayıda ve doğru yerleştirilmiş UV lambalarının çalışma saati dışında (örneğin gece boyunca ve/veya yemek/dinlenme aralarında) açık bırakılmasıdır. Burada en önemli husus UV ışığının gözlerde körlük, deride kanser yapabileceğinin unutulmamasıdır. Bu konuda en basit ancak en etkili önlemler UV lambalarına kumanda eden düğmenin oda dışında bulunması, lamba açık iken dışarıda uyarı ışığı yanması, lamba açık iken kapı açılırsa ses ile uyarı sağlayacak bir güvenlik önleminin alınmasıdır. Genel laboratuvar içinde bulunacak camlı ekim

odasında yanacak UV lambasının ekim odası dışında çalışanlara zararı olmaz. Bunun nedeni UV ışını spektrumundaki zararlı ışınların camdan dışarı geçememesidir.

- Otoklav ve yıkama odası tercihen mikrobiyoloji laboratuvarı dışında olmalıdır. Bunun nedeni laboratuvarda aşırı nemden kaçınmaktır.

- Besiyerleri ve kimyasal maddeler kuru, serin ve karanlık bir dolapta depolanmalıdır. Steril olan ve olmayan malzeme ayrı dolaplarda tutulmalıdır.

- Başta soğutucular ve inkübatörler olmak üzere sıcaklığa duyarlı ekipmanın yerleştirilmesine özen gösterilmelidir.

- Laboratuvarda ilk yardım dolabı bulunmalı ve personel en sık rastlanan kesilme, yanma gibi kazalarda ne yapması gerektiğini bilmelidir.

04. Laboratuvar Cihazları ve Ekipman

04.01. Otoklav

Sadece biyolojik stabilite testi ve mikroskopik testler yapan basit laboratuvarlar dışında bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarının en önemli cihazları arasında otoklav bulunmaktadır. Temel görevi basınç altında buharla sterilizasyondur. Farklı marka ve modellerde, değişik kapasitelerde ve şekillerde otoklavlar bulunmaktadır. Otoklavlanacak malzemenin özelliği, miktarı, otoklavlama sıklığı gibi fonksiyonlar dikkate alınarak otoklav seçilmeli, gerektiğinde birden fazla otoklav alınmalıdır.

Otoklavda sterilize edilecek besiyerleri ve çözeltiler ile kullanılmış ve yıkanmak üzere sterilize edilecek malzeme beraberce otoklavlanmamalı, tercihen bu 2 amaçla 2 farklı otoklav kullanılmalıdır. Eğer otoklavda otomatik bir hava boşaltma sistemi yoksa otoklav içindeki havanın iyice çıktığından emin oluncaya kadar buhar çıkış vanası açık tutulmalıdır. Bu vanadan sürekli ve düzenli olarak buhar çıkışı havanın boşaldığının göstergesidir.

Mikrobiyoloji laboratuvarında hatalı kullanıldığı için sahte pozitif ve sahte negatif sonuçların alınmasına neden olan cihazların başında otoklav gelir. Arıza nedeni ile geç ısınan ve/veya öğle yemeği vb. nedenlerle geç soğutulan otoklavdaki besiyeri gereğinden fazla ısı yüküne maruz kaldığından besiyeri performansı azalır. Besiyerlerinin sterilizasyonu için kullanılacak otoklav çabuk ısınıp normal sürede soğutulmalıdır. Otoklav içi sıcaklığının doğruluğu ise termokopul ile test edilmelidir.

04.02. İnkübatör

Yine laboratuvarın çalışma yüküne ve amaçlara göre farklı sıcaklıklarda çalışan (20-28 °C; 37 °C; 55 °C vb.), farklı büyüklüklerde, standart, anaerobik (vakumlu veya karbondioksitli), geri soğutmalı, çalkalamalı gibi çeşitli özelliklerde inkübatör(ler) mikrobiyoloji laboratuvarının önem sırası açısından önde gelen cihazları arasındadır. Mikrobiyoloji laboratuvarında inkübatörler prensip olarak kurutma ve/veya sterilizasyon amacı ile kullanılmamalıdır. İnkübatörlerde sıcaklık değişimi ± 1 °C olmalı, aşırı dolumdan kaçınılmalı, yerleştirmede hava sirkülasyonu sağlanacak şekilde boşluklar bırakılmalıdır. Petri kutuları ve tüpler inkübatörün

yan duvarlarından 25 mm içeriye yerleştirilmeli, inkübatörün sıcaklık değişimi sık sık minimum-maksimum termometre ile kontrol edilmelidir. Laboratuvarın çalışma düzeni inkübatörün kapağını en az açık tutacak şekilde planlanmalıdır. İnkübatörlere direk güneş ışığı gelmesi önlenmeli, düzenli olarak temizlik ve dezenfeksiyon yapılmalıdır. İnkübatörde üst üste 6 'dan fazla petri kutusu konulmamalı, petri kutuları arasında hava sirkülasyonu sağlamak için en az 25 mm boşluk bırakılmalıdır.

04.03. Etüv (Kuru Hava Sterilizatörü)

Yıkanmış cam malzemenin kurutulması için 50-60 °C sıcaklıklarda çalışan bir etüv ile cam ve metal malzemenin sterilizasyonu için, 180 °C' da sıcaklıkta çalışan bir etüve gerek vardır. Sterilizasyon amaçlı etüv kurutma amacı ile de kullanılabilir. Etüvde sadece cam ve metal malzeme sterilize edilmeli, düzenli olarak temizlik yapılmalıdır. Kurutma amaçlı kullanılan ayrı bir etüv varsa düzenli temizliğe ilaveten belirli aralıklarla dezenfeksiyon yapılmalıdır.

04.04. Su Destilasyonu

Besiyerlerinin hazırlanması için kullanılacak olan su cam destilatörde destile edilmiş olmalıdır. Bunun nedeni metal destilatörlerde destile su içinde metal iyonları kalabilmesi, bunun mikrobiyel gelişmeyi inhibe edici özellik gösterebilmesi, oysa cam destilatörlerden suya bu şekilde bir olumsuzluk geçmemesidir. Çeşitli çözeltilerin hazırlanmasında ve/veya yıkanmış malzemenin durulanmasında metal destilatörden elde edilen su veya deiyonizatörden elde edilen su kullanılabilir. Ancak iyon değiştirici kolonlardan elde edilen demineralize suyun yüksek sayıda mikroorganizma bulundurabileceği unutulmamalıdır. Mikrobiyoloji laboratuvarında taze hazırlanmış ve pH'sı 6,5 - 7,5 olan suyun kullanılması önerilir. Depolanmış suda atmosferik karbondioksit absorpsiyonuna bağlı olarak asidik özellik kazanma eğilimi vardır. Besiyeri bileşiminde kullanılacak su depolanacak ise kapların temizliğine özen gösterilmesi, kapların depolama öncesi iyice yıkanması ve saf su ile durulanması gerekir.

04.05. Hassas Terazi

Tercihen $\pm 0,01$ g ve $\pm 0,0001$ g duyarlılıkta 2 adet hassas terazi bulunmalı, teraziler kolaylıkla temizlenebilir modellerden seçilmelidir. Hassas terazi laboratuvarında titreşimlerden arındırılmış düzgün bir yere konulmalı (bir başka deyiş ile hassas terazinin bulunduğu tezgahta çalkalamalı su banyosu, homojenizatör vb. cihazlar olmamalı), hassas terazi yer değiştirilmemelidir. Terazi, haftada en az 1 kez standart ağırlık ile kontrol edilmeli, standart ağırlık ile ölçülen ağırlık arasında fark varsa yetkili servise başvurulmalı, yılda en az 1 kez yetkili servis tarafından kalibrasyon yapılmalıdır.

04.06. pH metre

pH metre üretici firmanın önerisi doğrultusunda kullanılmalı, ölçümden ve temizlendikten sonra yine üretici firma önerisi doğrultusunda elektrot korunmalıdır. pH metre her gün standart test çözeltileri ile (en yaygın kullanılanlar 4,00; 7,00; 11,00) kontrol ve gerekirse kalibre edilmelidir.

04.07. Karıştırıcılar

Amaca uygun manyetik karıştırıcı ve t p karıştırıcısı her mikrobiyoloji laboratuvarında bulunması gereken basit ancak önemli cihazlardır. Manyetik karıştırıcının ısıtıcı tablaya sahip olması çoğu kez tercih edilen bir durumdur.

04.08. Homojenizatörler

Katı örneklerin ilk çözeltilerini yapmak için çok farklı sistemler ve cihazlar bulunmaktadır. Bu cihazlar başlıca steril torbalı peristaltik homojenizat rler (stomacher) ve rotary homojenizat rler (blender) olarak iki grupta toplanır.

04.09. Su Banyoları

Agarlı besiyerlerini eritmek, veya sterilizasyon sonrası donmasını önlemek ve özel çalışmalarda inkübasyon sağlamak gibi amaçlarla laboratuvarında standart, çalkalamalı, mikroprosesör kontrollü su banyoları kullanılmaktadır. Su banyolarında kullanılan su sürekli olarak yenilenmeli, düzenli olarak temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidir. Özel inkübasyon koşullarının sağlanması için kullanılacak su banyoları mutlaka termostatik kontrol ünitesine sahip olmalı, termostatik kontrol ünitesinden bağımsız çalışan ayrı bir termometre ile su sıcaklığı kontrol edilmelidir.

04.10. Aşılama Kabini

Aşılama kabini, analiz edilecek ürüne dışarıdan toz ve mikroorganizma bulaşmasını önlemek amacıyla kullanılan kabinlerdir. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında kullanılan aşılama kabininde 1 m³ havada 4000 'den fazla toz partikülü bulunmamalıdır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında düşey tip (vertikal) laminar air-flow cihazları (tip/sınıf II kabin) kullanılmalı, yatay tip (horizontal) laminar air flow cihazları ise ancak patojen riski olmadığında kullanılmalıdır. Çalışma sırasında genel amaçlı bir agarlı besiyeri ( rneğin Plate Count Agar) kapağının açık bırakılması ve çalışma sonunda bu petrinin inkübasyona bırakılması ile kabindeki mikroorganizma yükü kontrol edilebilir.

04.11. Diğer Cihazlar

Laboratuvarın işlevine göre yeterli niteliklerde mikro dalga fırın, mikroskop ve/veya binoküler, santrifüj, vakum pompası, membran filtrasyon seti, soğutucu (buzdolabı ve/veya derin dondurucu), UV el lambası, koloni sayıcı, çalkalayıcı ve sallayıcı, termokopul, gibi cihazlara da gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında sıklıkla rastlanmaktadır.

Bunların dışında daha ziyade büyük ve araştırmaya dayalı gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında gelişmiş sistemlerle çalışan bilgisayar bağıntılı sayım, identifikasyon vb. cihazları da bulunmaktadır.

04.12. Ekipman

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarının ekipmanı olarak ilk akla gelenler cam malzeme (petri kutuları, pipetler, ölçü silindirleri, balonlar, tüpler, erlenler, drigalski spatülleri, beherler, şişeler vs.), metal malzeme (spatüller, aşı özesi ve iğnesi vs.), plastik malzeme (bir kez kullanılıp atılan petri kutuları vs.), bunzen bekleri, tüp sporları ve sepetleri vb. malzeme ile temizlik ve dezenfeksiyon amaçlı malzeme, çeşitli boya ve çözelti kapları, çeşitli termometreler, manometreler özel amaçlı kaplardır. Bunlara ilaveten kirli malzemenin konulacağı özel kaplar, besiyeri ve kimyasal madde dolapları, cam malzeme dolapları, steril malzeme dolapları yine gıda mikrobiyolojisi laboratuvarının temel ekipmanı içinde yer almaktadır. Son zamanlarda sterilize edilebilir plastik malzemeden yapılmış olan erlen, balon, beher, ve mezürler gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında yoğun olarak kullanılmaktadır.

05. Tipik Laboratuvar Hataları

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında gerçekte olduğundan daha az ya da ya da daha fazla sayım sonuçları alınabilmekte, yanlış tanımlamalara bağlı olarak sahte negatif ya da sahte pozitif bulgular elde edilebilmektedir. Bu tip hatalar pazara sunulan ürünün istenilen kalitede olmamasına ve dolayısıyla işletmenin kalite politikasına olumsuz etki yaptığı gibi yasal denetlemeler sırasında da sorun yaratmaktadır.

Laboratuvarda tüp pamuklarının yanması, alkolün alev alması, pamuğun yere düşmesi, cam malzemenin kırılması ve elin kesilmesi gibi günlük aksamalar laboratuvarın iş yoğunluğu ile paralel olarak artar. İş yoğunluğunun personelin kaldıramayacağı kadar yoğun olması ve/veya laboratuvar alanının yetersizliği pek çok aksama neden olurken teknik bilgi eksikliği de kayda değer ölçüde sorun yaratmaktadır.

Üniversiteler, kamu araştırma kuruluşları ve kamu kontrol kuruluşlarındaki laboratuvarlarda da hata olabilmektedir. Amaç en doğru sonucu almaktır. İlgili bölümlerde tüm analizlerin en doğru şekli verilmekle beraber bu bölümde olası laboratuvar hataları toplu halde gösterilmiştir. Burada belirtilen hataların asla küçümsenmeyecek büyük bir bölümü üniversitelerde, kamu araştırma ve kontrol kuruluşlarında, gıda sanayiinde tarafımızca görülmüş olan hatalardır.

05.01. Genel Laboratuvar Hataları

Çalışılan materyalin "mikrop" olduğunun unutulması. Basit bir analizde bir tüp veya petride trilyonlarla ifade edilecek sayıda mikroorganizma geliştiğinin bilinmemesi ya da dikkate alınmaması.

Laboratuvarın aynı zamanda mikrobiyolojik gıda kontrolü ve starter üretimi görevini üstlenmesi.

Planlama ve inşaat aşamasında laboratuvar yönü ve/veya camların konumu nedeni ile özellikle sıcak yaz aylarında laboratuvar sıcaklığının (bunzen beklerinin de etkisi ile 30 °C üzerine çıkmasına bağlı olarak 28 °C 'da yapılması gereken inkübasyonlarda sağlıklı sonuç alınmaması, benzer şekilde inkübatörlerin güneş alan yerlere konulması.

Cam malzemenin yeteri kadar temizlenmeden ve/veya durulanmadan kullanılması, özellikle pipetlerin kirli olarak etüvde sterilize edilmesi sonucunda pipet iç yüzeyinde organik maddeler yanması ve bu durumun hem pipetteki hacimlerin rahatlıkla görülmesini engellemesi hem de bu tabaka nedeni ile daha az hacmin pipetlenmesi, yıkama sonrası iyi bir durulama yapılmaması özellikle tüplerde hazırlanan besiyerlerine ve seyreltme çözeltilerine deterjan bulaşması ve sonuçta deterjanın aranacak/sayılacak mikroorganizma üzerine olumsuz etki yapması.

Sadece ekimi yapılmamış petri kutuları ve tüpler ile rutin gıda kontrolünde (bozuk gıda ve/veya bozuk olduğundan endişe edilen gıda hariç) kullanılan dilüsyon erlenleri ve tüplerinin 30 dakika içinde olmak kaydı ile sterilize edilmeden yıkanabileceğinin, buna karşı mikroorganizma gelişmesi olmuş malzemenin sterilize edilmeden yıkanmaması veya atılmamasının bilinmemesi.

Yanlış inkübasyon sıcaklığı ve/veya süresi seçimi, anaerob koşullarda yapılması gereken inkübasyonda anaerob koşulun sağlandığının kontrol edilmemesi, mikroaerofillerin anaerob ortamda inkübe edilmesi, inkübasyon sırasında anaerob kavanozun kapağının açılarak yeni petri ilave edilmesi ancak yeni bir kimyasal oksijen bağlayıcı poşet konulmaması ve eski poşetin yeterli olacağına sanılması.

İnkübatör(ler), pH metre, su banyosu vb. cihazların kalibrasyon hataları, saf su cihazının temizlenmemesi, çalışma atmosferinin ve tezgahların kirli olması.

Özellikle sıcak yaz günlerinde laboratuvar havasının sıcak olması nedeni ile ekim sırasında pencerelerin açık bırakılmasına ve/veya laboratuvarda vantilatör çalıştırılmasına bağlı olarak ekimler sırasında besiyerlerinin kontamine edilmesi.

Laboratuvarda sadece acil kullanım için her an el altında ancak, günlük kullanılan malzeme deposunda değil, ayrı bir yerde bulunması gereken 3-5 adet steril petri kutusu, 3-5 adet steril boş tüp, yeterli sayılarda ve boyutlarda steril erlen, steril 9 ml ve 90 seyreltme çözeltileri, yeterli miktar ve hacimlerde pipet olmaması ve "her şeyin planlandığı gibi gitmeyeceğinin bilinmemesi" nedeni ile çalışmanın en küçük bir aksamada tümüyle durması.

Seyreltmede kullanılacak tüplerin tam 9,0 ml olarak hazırlanması gerektiğinin bilinmemesi ve 10 ml olarak hazırlanması, ya da EMS yönteminden kalan bir alışkanlık ile tüplere 8 - 8,5 ml arasında serum fizyolojik konulması. Baird-Parker Agar besiyerine MUG ilave edilerek aynı besiyerinde *E. coli* ve *Staphylococcus aureus* 'un beraberce sayılabileceğinin sanılması.

05.02. Örnek Hazırlanması ve Ekim Hataları

Analize alınacak örneğin uzun bir süre beklemesi, örneğin yetersiz homojenizasyonu, anaeroblar aranacak/sayılacak ise blenderde uzun süreli homojenizasyon sırasında örneğin aşırı oksijenle teması, yanlış çözelti ile seyreltme, seyreltme sırasında bazı tüplerin unutulması ve/veya aynı tüpe iki kez seyreltme yapılması, seyreltme sırasında tüplerin yeterli bir homojenizasyon sağlayacak şekilde karıştırılmaması, seyreltmede pipetleme hataları, dalgınlık ve/veya düzensizlik nedeni ile sterilize edilmemiş pipetlerin ve/veya seyreltme çözeltilerinin kullanılması, seyreltme yapıldıktan sonra ekim öncesi uzun süre beklenmesi, hatalı seyreltme düzeyi seçilmesine bağlı olarak sayım sonucu alınmaması, seyreltmede kullanılan tüplere seyreltme oranlarının yazılmamasına bağlı olarak ekim yapılan petri kutusu üzerine yazılan seyreltme oranı ile ekimin yapıldığı tüpün seyreltme oranının farklı olması, petri kutusuna

seyreltme oranının yazılmasının unutulması ya da dalgınlıkla hatalı yazılması, bazı seyreltme tüplerinden petrilere ekim yapılmaması ve/veya bazılarında iki kez ekim yapılması.

Ekim sırasında pipetin üflenmesi, yayma ekim yönteminde kullanılan cam çubuğun (Drigalski spatülü) alkol ile sterilizasyonunda alkolün eskimesine bağlı olarak konsantrasyonunun azalması ve dolayısı ile kontamine olması, daha doğru olur diyerek %70 (v/v) yerine daha konsantre hatta saf alkol kullanılması, alkolde bekletme süresinin kısa olması, drigalski spatülünün alkolün alev ile uzaklaştırılmadan besiyerine teması, alkolün uzaklaştırılması için alevde uzun süre tutmaya bağlı olarak spatülün ısınması ve bu şekilde yayma yapılırken mikroorganizmalara zarar verilmesi, petri kutusuna ekimden sonra yayma işlemi için uzun süre geçmesi, damlatma yöntemi ile çalışılırken düz olmayan zeminde ekim yapıldığı için damlaların kayması ve/veya damla tam olarak emilmeden Petri kutusunun inkübatöre ters olarak konulması, dökme yöntemi ile çalışılırken agarlı besiyerinin çok sıcak dökülmesine bağlı olarak mikroorganizmaların zarar görmesi veya besiyeri katılırken dökmeye bağlı olarak petri kutusundaki örnekle yeterli karışmaması. Besiyerlerinde optimum kurutma yapılmadan aşırı nemli ya da aşırı kuru halde iken ekim yapılması.

Membran filtrasyonda filtrenin ıslatılmadan destek tablası üzerine konulması, filtre üzerindeki plastik tabakanın çıkarılmadan kullanılması, filtrenin destek tablasına ters olarak konulması ve/veya petri kutusuna ters olarak yerleştirilmesi, filtrenin destek tablasına düzgün yerleştirilmemesi, filtrenin mekanik olarak zarar görmesi (en çok pens ile yırtılması), ön filtrasyon yapıldığında ön filtrenin de ayrı bir besiyerine konularak burada da sayım yapılması ve sonucun iki filtredeki sayımların toplamı olduğunun bilinmemesi, sıvının filtrasyonu tamamlandıktan sonra filtre üzerinde kalabilecek klor gibi koruyucu maddelerin uzaklaştırılması için 80-100 ml kadar steril su ya da steril özel yıkama çözeltisi geçirilmemesi veya bunların sterilize edilmeden kullanılması.

EMS yönteminde 10 ml örnek pipetlenecek besiyerlerinin başlangıçta çift kuvvette hazırlanmaması ve/veya bunların 18 X 180 mm büyük tüp yerine standart 16 X 160 mm tüplere hazırlanması, çift kuvvette hazırlanmış besiyerlerine standart 1 ml ekim yapılması, durham tüpü bulunan tüplerin mekanik karıştırıcıda karıştırılarak başlangıçta bu tüplere hava girerek "gaz pozitif" olması ve/veya yetersiz otoklavlamaya bağlı olarak otoklav çıkışında bu tüplerin içinde hava kabarcığı kalması, EMS' de seyreltme kavramının ısrarla anlaşılmasına bağlı olarak orijinal örnekten (10^0 seyrelti) 1 ; 0,1 ve 0,01 ml pipetlenmesi ya da katı örnekten 1 ; 0,1 ve 0,01 g tartılarak tüplere ilave edilmesi, ekimi yapılan tüplerin seyreltme tüpü olarak değerlendirilip sonraki 3 tüpe bir önceki tüpten 1' er ml ekim yapılması (bu yöntem durham tüpü kullanılmadığı için rahatlıkla mekanik olarak karıştırılabilen ve tam 9,0 ml olarak hazırlanmış besiyerleri için matematik olarak doğru olmakla beraber laboratuvar disiplinine uymayan ve gereksiz bir uygulamadır).

05.03. Besiyerlerinin Hazırlanmasındaki Hatalar

Yanlış tartım ve/veya sulandırma, bir kavanoz içinde duran besiyerinin hangi firmaya ait olduğu bilinmediği için başka firmaya ait katalogdaki bilgiler ile hazırlanması, dalgınlıkla "A" besiyeri yerine "B" besiyeri hazırlanması, besiyerinin eskimesi ve/veya nem alması, nötral olmayan ve/veya yeterince saf olmayan su kullanılması, besiyeri katalogu ve/veya besiyeri kutusundaki pH' nın otoklavlama sonrasındaki pH olduğu bilinmediği için otoklavlama öncesi besiyerinin anılan pH' ya ayarlanması, bileşenler tam olarak erimeden sterilizasyon, besiyeri hazırlandıktan uzun bir süre sonra sterilize edilmesi, otoklavlanmaması gereken besiyerlerinin otoklavlanması

ve/veya aşırı ısı girişine yol açacak şekilde yüksek ısı işlem normu ile otoklavlanması, otoklavlanmaması gereken besiyerlerinin kaynar su banyosunda yetersiz ısı işlem ile yetersiz sterilizasyonu, steril katkıların kontamine edilmesi, steril katkıların besiyeri 50 °C üzerinde iken ilave edilmesi, katkı ilavesinin unutulması ya da dalgalılıkla başka katkı ilave edilmesi ya da katkının gereğinden az veya çok ilave edilmesi, katkının buzdolabından çıkarıldığı sıcaklıkta bazal besiyerine ilavesi, agarlı besiyerlerinin çok sıcak veya çok soğuk dökülmesi ya da karışıklık nedeni ile sterilize edilmemiş petri kutularına dökülmesi, besiyeri yüzeyinin gereğinden fazla nemli ya da kuru olması, otoklavın bozuk olması nedeni ile besiyerinin aşırı ısı işleme maruz kalması, otoklavın alt bölmeleri ile üst bölmelerinin farklı sıcaklıkta olması veya buna neden olacak şekilde aşırı doldurma, tüplerdeki sıvı besiyeri ile 1 litre hacimli agarlı besiyerinin beraber otoklavlanmasına bağlı olarak tüplerin aşırı ısı alması ve/veya erlendeki besiyerinin yetersiz sterilizasyonu, tüplerin tel sepet yerine beher veya konserve kutusu içinde otoklavlanması ve bu yüzden kalacak hava paketleri nedeni ile tüplerin yetersiz sterilizasyonu, otoklav havası tam boşaltılmadan buhar çıkış vanasının kapatılması, otoklavlama işleminin yemek saati veya başka analizlerin yoğunluğu nedeni ile geç açılması ve dolayısı ile besiyerinin aşırı ısı girişi, 121 °C' da 15 dakikalık ısı işlem uygulamasının etüvde (kuru hava sterilizatöründe) yapılması, hazırlanmış besiyerlerinin laboratuvarında güneş alan tezgah üzerinde uzun süre bırakılması, ısı işlem duyarlı agarlı besiyerlerinin tekrar eritilmesi, agarlı besiyerlerinin depolama amacı ile dondurulması.

05.04. Testlerde Yapılan Hatalar

Kullanılan çözeltilerin eskimesine, yanlış hazırlanmasına ve/veya kullanılmasına ve/veya testin yanlış uygulanmasına bağlı olarak sonucun yanlış alınması, test sonucunun yanlış değerlendirilmesi. Karbohidrat testlerinde uzun inkübasyon süresine ve/veya test edilen bakterinin aktivitesine bağlı olarak tüpteki karbohidratın bitmesi ve bakterinin peptonu kullanarak pH' yı yükseltmesine bağlı olarak sahte negatif sonuç alınması. Biyokimyasal test uygulanmış (örneğin indol testi yapılmış) tüpten izolasyon amacı ile katı besiyerine ekim yapılması.

05.05. Değerlendirme Hataları

Petri kutusunda yayılmış kolonilerin 1 adet olarak sayılması gerektiğinin bilinmemesi, özellikle seyreltme faktörünün petri kutularına yazılma hatalarına bağlı olarak yanlış hesaplama, MUG ilave edilmiş agarlı besiyerlerinde uzun süreli inkübasyon sonrası floresan ışımının yayılmasına bağlı olarak sahte pozitif değerlendirmeler.

EMS yöntemi ile yapılan değerlendirmelerde 3 tüp yöntemi kullanıldığı halde sonuçların 5 tüplü ekim tablosundan elde edilmesi, EMS tablosunun özellikle seyreltme kavramına bağlı olarak yanlış değerlendirilmesi, MUG ilave edilmiş sıvı besiyerlerinde tüplerin kendiliğinden floresan ışımaya verip vermediğinin önceden kontrol edilmemesi ve dolayısıyla sahte pozitif sonuç alınması, aşırı asit oluşturan bakterilerin MUG reaksiyonunu perdelemesine bağlı olan sahte negatif sonuç alınması, sadece gaz pozitif tüplerde MUG reaksiyonuna bakılması gerektiğinin bilinmemesi ve gaz olmayan tüplerde de floresan kontrolü, mikotoksin çalışmaları için kullanılan UV lambalarının MUG reaksiyonunun belirlenmesinde kullanılması, floresan negatif tüplere indol testi yapılması ve bu tüplerden indol pozitif olanların *E. coli* olarak sayılması.

Bazı bakterilerin gram reaksiyonlarının kültürün yaşına göre değiştiğinin bilinmemesi, bazılarının ise gram boyama işlemine çok duyarlı oldukları için gram boyamada uygulanacak sürelerdeki en küçük farklılığın sonucu etkileyeceği ve bu durumun genellikle aslen gram pozitif olan bakterinin gram negatif olarak görüleceğinin bilinmemesi, boya kristallerinin bakteri ile karıştırılması, lamın boyama yapılmayan yüzünde görüntü aranması, çabuk sonuç almak için fiksasyon öncesi kültürün yeterli kurutulmaması ve/veya çabuk kurutma için aşırı ısı uygulanması ve/veya son yıkamadan sonra mekanik kurutma sırasında boyanmış hücrelerin de lamdan uzaklaşması, mayalara gram boyama uygulanması ve sonucun tartışılması, kokobasillerin (eni boyuna yakın çubuk bakterilerin) kok olarak değerlendirilmesi, mikroskopik inceleme sırasında streptokokların ve stafilokokların monokok ve diplokok şeklinde olan parçaları görüldüğünde incelenen kültürün bulaşık olduğunun sanılması, mikroskopik inceleme ile *E. coli* 'nin tanınacağına sanılması, Howard yöntemi ile yapılan sayımlarda domates parçalarının küf hifi yerine sayılması. Thoma lamında büyük kare sınırlarının anlaşılabilmesi ve buna bağlı olarak bazı karelerin sayılmaması ya da yarım kare olarak sayılması.

06. Laboratuvarın Otokontrolü

Beklenmeyen bir sonuç alındığında yapılabilecek fazla bir şey yoktur. Asıl önemli olan hataların en aza indirildiğinden emin olunmasıdır. Bu ise şahit kültür ile çalışmakla sağlanır. Şahit kültürler en az ayda bir kez analiz edilen örneğe ilave edilerek beklenen pozitif ve negatif sonuçların alındığı görülmelidir. Bir diğer deyiş ile analiz laboratuvarı belirli aralıklarla otokontrol yapılmalıdır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında bu amaçla özellikle istenmeyen patojenleri içeren basit bir kültür koleksiyonu bulunmalıdır.

Kültür koleksiyonunda bulunan şahit mikroorganizmalar sadece istenmeyen patojenleri değil analiz yapılan örnekte refakatçi olarak bulunan ve analizde kullanılan sistem/besiyerinde görülebilen florayı da içermelidir. Örneğin her koleksiyonda *E. coli* mutlaka bulunmalıdır. Ancak bunun yanında koliform grubun diğer üyeleri de (*Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* vb.) aynı koleksiyonda bulunmalıdır. Laboratuvar otokontrolü sırasında bu bakteriler karışım olarak en az 10^3 /ml-g düzeyinde doğrudan analiz edilen gıdaya katılmalı ve sayım sonucu bu düzeyde elde edilmelidir. Aynı gıdanın şahit mikroorganizma ilave edilmemiş orijinal örneğinde de paralel çalışma yapılmalı ve sonuçlar karşılaştırılmalıdır.

Biyokimyasal (ve yapıyor ise serolojik) testler de aynı şekilde pozitif ve negatif şahit kültürler ile kontrol edilmelidir. Beklenen sonucu verecek olan bakteri pozitif kontrol, vermeyecek olan negatif kontrol olarak tanımlanır. Örneğin indol testi yapmak için 10 ml kültür üzerine 0,5 ml Kovacs' indol çözeltisi katıldığında 3-5 saniye içinde üstte vişne çürüğü halka oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilirken bu renk bir halka olmaması negatif sonuçtur. İndol testinin doğru uygulandığından emin olunması için yapılan kontrolde *E. coli* pozitif şahit, *Enterobacter aerogenes* negatif şahit olarak kullanılmalıdır.

Sadece testler değil kullanılan besiyerlerinin performansı da aynı şekilde kontrol edilmelidir. Bir besiyeri kutusu bitip yerine yenisi açıldığında eski ve yeni kutuların aynı mikroorganizma kültür(ler)i ile beraberce ekilmesi ve sonuçların kontrol edilmesi gözden kaçan ancak önemli bir ayrıntıdır.

Her analiz sırasında pozitif ve negatif şahit bakteriler kullanılarak sistemin tümüyle kontrol edilmesi gereksizdir ve bu kontrolün yukarıda da belirtildiği gibi ayda bir kez yapılması veya testler için yeni çözelti hazırlandığında yapılması yeterlidir. Bununla beraber her analizde

yapılması gereken çalışma atmosferi ve besiyerinin yeterince steril olup olmadığının kontrolü gerekir. Hazırlanan her besiyerinden en az 2 adet fazla hazırlanmalıdır. Bunlardan en az biri ekim yapılmadan inkübatöre konulmalı ve böylece besiyerinin steril olup olmadığı denetlenmelidir. En az bir petri kutusu ise (özellikle toplam bakteri ile maya-küf sayımlarında) çalışma sırasında ağzı açık olarak 5 dakika tutulmalı ve bu petri kutusu "çalışma atmosferinin kontrolü için" inkübatöre konulmalıdır. Analiz edilen örnekten yapılan ekimler sırasında petri kutularının kapakları tümüyle 5 dakika süre ile açık bırakılmadığı için bu petrilerde en fazla 1-2 bakteri ve/veya küf kolonisine izin verilebilir. Drigalski spatülünün dezenfekte edildiği alkolün kontrolü için burada tutulan spatülün alevden geçirilmeden bir besiyerine aktarılması, besiyerine seyreltmede kullanılan steril (olması gereken) çözeltiden aktarılarak bunun kontrol edilmesi daha sık olarak yapılması gereken kontroller arasındadır.

Her çalışma sırasında bir besiyerinin pozitif şahit ile aşılması özellikle *Salmonella*, *Listeria* gibi yüksek patojenite gösteren bakteriler arandığında ve/veya pazara verilecek ürün özellikle risk grubu yüksek olarak tanımlanan bebekler – hamileler – hastalar - yaşlılar için hazırlanmış ise ayrımının ötesinde zorunlu bir uygulamadır.