

09. Kùltür Koleksiyonu ve Otokontrol ¹

Her laboratuvarında günlük analizlerde kullanılan bakterilerin düzenli bir kùltür koleksiyonu bulunmalı, bu koleksiyon günlük analizlerde pozitif şahit olarak kullanılmak üzere korunmalıdır. Biyokimyasal testler uygulanıyorsa test sonucunu pozitif ve negatif olarak veren kùltürlerin de koleksiyonda bulunması gereklidir. "37. Basit Biyokimyasal Testler" bölümünde testler için pozitif ve negatif şahit bakteri örnekleri verilmiştir.

Örneğin, bir gıda işletmesi laboratuvarında *E. coli* analizi günlük olarak yapılıyorsa bu laboratuvarında *E. coli* kùltür koleksiyonuna alınmalıdır.

Koleksiyonun en önemli işlevi, belirli aralıklarla bakterinin analiz yapılan gıdaya ilave edilmesi ve gerek var/yok testlerinde, gerek sayım testlerinde geri alınması ya da ilave edilen miktarın sayım ile doğrulanmasıdır. Bu şekilde laboratuvarında uygulanan yöntemin kontrolü yapılmış olmaktadır.

Geri alma testleri ile sayım testlerinde kullanılacak bakteri sayılarının farklı olacağı açıktır. Örneğin, bir laboratuvarın *Salmonella* analizi açısından yetkinliğinin onaylanması için *Salmonella* / *E. coli* oranı 1:10⁶ olan karışım içinden *Salmonella* geri alınmalıdır. *Salmonella* analizi yapan standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı için *Salmonella* / *E. coli* oranının 1:10⁴ olması yeterlidir.

Buna göre basit olarak, CASO (Tryptic Soy) Broth (Merck 1.05459) gibi standart bir sıvı besiyerinde 10⁸ kob/mL gelişme olacağı varsayımı ile; içinde *Salmonella* olmadığı bilinen 25 g (mL) gıda örneğine *E. coli* 'nin CASO Broth kùltüründen doğrudan 0,1 mL ve *Salmonella* 'nın CASO Broth kùltürünün 10⁻⁴ seyreltisinden 0,1 mL ilavesi ve bu gıda örneğinin *Salmonella* açısından analizi ile *Salmonella* pozitif sonuç alınması gerekmektedir.

Bu şekilde yapılan bir analizde *Salmonella* pozitif bulgu, bu analizi yapan laboratuvarın rutinde kullanılan *Salmonella* analizi için gerek yöntem gerek personel yetkinliği konusunda tatmin edici olduğunu gösterecektir.

Yukarıda verilen örneğe göre *Salmonella* kùltürünün 10⁻⁵ seyreltisinden 0,1 mL ilavesi ve *Salmonella* 'nın pozitif olarak alınması bir öncekine kıyasla 10 misli daha yetkin ve daha duyarlı analiz yapabilen bir laboratuvarı gösterir.

Burada, CASO Broth kùltürlerinin 10⁸ kob/mL olduğu varsayılmaktadır. Bu tip çalışmalarda CASO Agar (Merck 1.05458) ya da Plate Count Agar (Merck 1.05463) gibi genel bir besiyerinde çalışılan kùltürün mL'sinde kaç adet bakteri olduğu ayrıca belirlenmelidir. Görüldüğü gibi, bu analizi yapacak laboratuvarın elinde analiz yapılan tüm besiyerleri ve diğer analiz kitleri yanında *Salmonella* ve *E. coli* kùltürleri de koleksiyonda bulunmalıdır.

Her ne kadar, kùltür koleksiyonu konusunda başta liyofilizasyon (dondurarak kurutma) olmak üzere çok farklı yöntemler bulunmakta ise de, standart analiz yapan bir gıda laboratuvarı için

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 09. bölümüdür.

kültür koleksiyonu çok basit kültür koruma yöntemleri ile düzenlenmek durumundadır. Aşağıda çok küçük bir kültür koleksiyonu oluşturmak için yöntem açıklanmaktadır:

-CASO Broth gibi sıvı bir besiyerinde haftalık pasajlarla kültürün canlılığı ve aktivitesi korunsa da, bu yöntem önerilmez. Zaman içinde genetik deformasyon olabilir. Amaç, koleksiyondaki kültürün en az sayıda aktifleştirilmesidir. Her aktifleştirmede kültürün kendi özelliklerini yitirme şansı artar.

-Buna göre, kültürün katı besiyeri ortamında korunması zorunludur.

-Genel olarak, yatık CASO Agar besiyerine daldırma ve yüzeye sürme yöntemi gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren pek çok bakteri için geçerli bir yöntemdir. Yatık agar hazırlanması 03.03.04. Bölümde verilmiştir.

-Yatık agar katılaştıktan sonra sıvı kültürden aşı özesi ile yüzeye sürme ve aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır.

-İdeal olarak bu inokülasyonlar en az 2 tüpe yapılır. İnoküle edilen tüpler 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda tüplerin üzerinde gerekli bilgiler (bakteri adı, koleksiyona alındığı tarih, kullanılan besiyeri vb.) yazılı olmak kaydı ile standart buzdolabı sıcaklığında korumaya alınır. Tüplerde kurumunun önlenmesi için parafilm ile sarılması gereklidir. Daha işlevsel olmak üzere bu besiyeri vida kapaklı tüplerde hazırlanır. Bu amaçla mutfak tipi stretch film de başarılı ve tatmin edici şekilde kullanılmaktadır.

-Koleksiyona alınan bakteri cinsi ile doğrudan ilişkili olmak üzere kullanılan besiyeri çeşidi önemlidir. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren bakterilerin büyük çoğunluğu basit olarak CASO Broth ve CASO Agar besiyerinde gelişmekle birlikte, *Vibrio* için CASO Broth (agar) + NaCl ve *Clostridium* için anaerob ortam gerektiği göz ardı edilmemelidir.

-Örnek alınması gerektiğinde, koleksiyondaki tüpten bir öze kültür alınıp, CASO Broth, Nutrient Broth (Merck 1.05443) gibi uygun bir sıvı besiyerine aktarılır ve uygun sıcaklıkta 24 saat inkübe edilir.

-Tüplerden birisi örnek alınması için kullanılır, diğeri ana stok olarak saklanır. Ana stok, ancak gerekirse kullanılır.

-6 ay sonunda ana stoktan alınacak bir öze kültür uygun bir besiyerinde inkübe edilir, tekrar aynı şekilde koleksiyona alınır.

-Ana stoktaki bakterinin gelişmemesi koşulunda CASO Broth gibi uygun bir steril sıvı besiyerinden 5 mL alınıp, stok yatık agar üzerine ilave edilir, tüp karıştırıcıda kuvvetlice karıştırılır ve tüp uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 24 saat sonunda buradan yine uygun bir sıvı besiyerine inokülasyon yapılır.

Gıda işletmeleri için kültür koleksiyonunda, patojen bakterinin laboratuvarındaki varlığına çok dikkat edilmelidir. Buna bağlı olarak koleksiyonun ancak yetkili ve deneyimli personel tarafından düzenlenmesi gereklidir. *Salmonella* kültür koleksiyonuna alınacak ise patojenik olmayan serotipleri ile çalışılması önerilir. *E. coli* O157:H7 serotipi ve diğer primer patojenler gıda işletmelerinde koleksiyona alınmamalı, gerekirse personelin konu üzerindeki eğitimi ve rutin geri alma kontrolleri akademik kurumlarda yapılmalıdır. Pek çok gıda işletme laboratuvarı patojen olmayan bir serotip de olsa hiçbir *Salmonella* ya da diğer herhangi bir patojeni işletme laboratuvarında bulundurmamak istemez.

ISO 11133 sayılı standartta kültür koleksiyonu için 3 kültür olması gerektiği belirtilmektedir:

-Referans Suş: Bir referans kültür koleksiyonundan liyofilize halde ve vakum altında sağlanmış olarak ya da bilinen bir kaynaktan en azından cins ve tür düzeyinde tanımlanmış kültürdür. Referans suşlar referans kültür koleksiyonundan ya da onaylanmış ticari satıcılardan sağlanmış ve orijinal ambalajlarında korunuyor ise, geliştirilmeleri ve kullanımları üretici kuruluşun talimatları doğrultusunda yapılmalıdır.

-Referans Stok: Referans suştan tek alt kültür yapılarak elde edilmiş sıvı besiyeri kültürüdür. Kalite kontrol ve performans testlerinde kullanılmak üzere hazırlanan referans suşların referans stokları çapraz kontaminasyon, mutasyon ya da tipik karakteristiklerinde değişim olasılıklarını en aza indirecek şekilde hazırlanmalı ve korunmalıdır. Referans stokların birden fazla sayıda sıvı kültürü hazırlanmalı ve bunlar derin dondurucuda (-70°C) ya da liyofilize edilerek korunmalıdır. Test organizması olarak kullanılacak olanların gelişme karakteristikleri kapların üzerinde tam olarak belirtilmelidir.

-Çalışma Kültürü: Referans stoktan elde edilen sıvı besiyeri kültürüdür. Liyofilize ya da derin dondurulmuş referans stoklardan hazırlanmalıdır. Sıvılar, referans stoklar arasında çapraz kontaminasyon ya da kültürün nitelik kaybı olmasına izin verilmeyecek şekilde hazırlanmalıdır. Çalışma kültürleri referans stoktan selektif olmayan bir sıvı besiyerine inoküle edilmeli ve durma fazına kadar inkübe edilmelidir. Çalışma kültürlerinden alt kültür yapılmamalıdır. Bununla beraber, çalışma kültürleri uygun depolama koşullarında bir haftadan daha uzun olmamak kaydı ile saklanmak ve çapraz kontaminasyonlara ve nitelik kaybına neden olmayacak şekilde kullanılmasına özen gösterilmek kaydı ile bir kereden fazla olarak da kullanılabilir.

Laboratuvar çalışmalarında otokontrol için çapraz denetlemeler yapılır. Bu denetlemeler günlük analizlerin dışında yapılmalıdır. Temel olarak 3 grup çapraz denetleme vardır:

-Analizlerden sorumlu (A) adlı teknik eleman (X) adlı kendi laboratuvarında aynı partiye ait en az 3 örnekte analiz yapılmalıdır.

-Analizlerden sorumlu (A) adlı teknik eleman (Y) adlı başka bir laboratuvarda aynı partiye ait en az 3 örnekte analiz yapılmalıdır.

-Başka bir laboratuvarın analizlerinden sorumlu (B) adlı teknik eleman (X) adlı laboratuvarda aynı partiye ait en az 3 örnekte analiz yapılmalıdır.

Bu şekilde yapılan çapraz denetleme sonuçları bir arada değerlendirilmeli, kişiler ve/veya laboratuvarlar arasında önemli fark görülüyorsa nedenleri araştırılıp, düzeltici faaliyet uygulanmalıdır.