Gıda Mikrobiyolojisi

Editör: Prof. Dr. A.Kadir HALKMAN

Yazarlar

AKPINAR, Merve
ATAMAN, Petek
BAĞDER ELMACI, Simel
HALKMAN, A. Kadir
HALKMAN, Bilge
HALKMAN, Hilal
KOÇAKER, Nevin
KOLCUOĞLU, Gülten
ÖMEROĞLU, Perihan Yolcı
ÖZÇELİK, Filiz
SAĞDAŞ, Özlem Etiz
SANCAR, Burcu Çakmak
YILDIRIM, Gülay
YILMAZ, Aysun

Ankara, 2019

Künye: Gıda Mikrobiyolojisi. 2019. Editör: A. Kadir Halkman. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd, Ankara, 648 s.
ISBN: 978-605-245-683-5

Yazar bilgileri

Arş. Gör. Merve AKPINAR; Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara. merve.akpinar@ankara.edu.tr

R. Petek ATAMAN; Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Lefkoşa. petekataman@gmail.com

Dr. Simel BAĞDER ELMACI; Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara. sbagder@eng.ankara.edu.tr

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN; Ankara Üniv., Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara. halkman@ankara.edu.tr

Bilge HALMAN; Orlab, Ankara. bilge.halkman@orlab.com.tr

Doç. Dr. Hilal HALKMAN; TAEK SANAEM, Ankara. hilalhalkman@gmail.com

Nevin KOÇAKER; Orlab, Ankara. nevin.kocaker@orlab.com.tr

Gülten KOLCUOĞLU; Orlab, Ankara. gulten.kolcuoglu@orlab.com.tr

Dr. Öğr. Üyesi Perihan YOLCI ÖMEROĞLU; Uludağ Üniv., Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa. pyomeroglu@uludag.edu.tr

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK; Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara. fozçelik@ankara.edu.tr

Özlem E. SAĞDAŞ; Orlab, Ankara. ozlem.sagdas@orlab.com.tr

Dr. Burcu ÇAKMAK SANCAR; İstanbul Esenyurt Üniv., Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Esenyurt İstanbul. burcu.cakmak@gmail.com

Dr. Gülay YILDIRIM; Çevre Endüstriyel Analiz Sanayi Ticaret A.Ş., Kağıthane, İstanbul. gulay_yildirim@hotmail.com

Doç. Dr. Aysun YILMAZ; İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul. yilmazaysun@istanbul.edu.tr

www.mikrobiyoloji.org sitesinden şifresiz ve ücretsiz olarak indirilebilir, dijital olarak bastırılabilir. *Kaynak gösterilmek kaydı ile* her türlü elektronik, fotokopi vb. kopyalamaya açıktır, ancak ticari gelir amacıyla satılamaz. Kâğıt baskılı kitap, OrLab Laboratuvar Market hediyesidir, satılamaz.

Düzenleme: Sim Ajans; 0532 616 2176, sami.uzunman@gmail.com

Baskı: Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd, Ankara

Dış kapak düzenleme: Özgün çalışma; Kolcuoğlu, G., Akpınar, M., Sağdaş, Ö.E., Karadeniz, G. (Prosigma/ LabMedya), Halkman, A.K.

Önsöz

Editörlüğünü yapmış olduğum Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları kitabı 2005 yılında 5500 adet basılmış ve devamında www.mikrobiyoloji.org sitesinde şifresiz ve ücretsiz olarak yayımlanmıştı. Bu kitap, Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları (2005) kitabının gözden geçirilmiş ikinci baskısı değildir. Kuşkusuz adı geçen kitabın bir bölümü bu kitaba taşınmıştır, ancak bu kitapta öncekinde olmayan pek çok yeni bölüm vardır. Devamında 2005 baskılı kitapta gözden kaçan teknik hataları bu kitapta düzelttik, bilgileri güncelleştirdik.

Bu tarihten (2019) çok yaklaşık 45 yıl öncesinde üniversite öğrencisi iken hocalarımdan duyduğum deyişi burada tekrarlayım: Bir kitap basıldığı gün eskimiştir. Bu kitap da muhtemelen öyle olacaktır çünkü dünya standartları sürekli değiyor.

Yine üniversitede taze asistan iken başta hocaların hocası olan ve doktora öğrencisi olduğumdan her zaman gurur duyduğum Prof. Dr. Ömer KÖŞKER'in bir sözünün bugün de geçerli olduğunu gördüm. *Mükemmel iyinin düşmanıdır*. Bu deyişi ihmal ettiğim için bu kitabın yayımlanması çok gecikti. Bu kitap mükemmel mi? Kesinlikle hayır. Bu kitabın yayımlandığı tarihte pek çok yeni standart yayımlanmış olabilir. Okuyucu elektronik ortamda ilerlemeleri/ değişen standartları izlemek durumundadır.

Öncesinde Hacettepe Üniversitesi Beytepe yerleşkesinde girişindeki dikili taşta Latince bir deyiş vardı: *Timeo Hominem Unis Libri*. Türkçesi ile *Tek kitabı olandan korkarım.* Şöyle devam edelim: Bu kitap Gıda Mikrobiyolojisi üzerindeki tek kaynak kitap değildir/ olmamalıdır. Dünyada konu üzerinde yüzlerce kitap, araştırma sonucu vardır. Bu kitabın okuyucusu, çok farklı kaynakları da okumalıdır. www.mikrobiyoloji.org sitesinde, bu kitabın gözden geçirilmiş versiyonları sürekli olarak güncellenecektir.

Bu kitap, www.mikrobiyoloj.org maddi desteği ile yayımlanmıştır. www.mikrobiyoloj.org sitesine bu desteği için teşekkür ediyorum. Sıla ve Elif'e kitabı noktasına ve virgülüne kadar Türkçe yazım kuralları açısından gözden geçirdikleri ve gereken düzeltmeleri yaptıkları teşekkür ediyorum. Hâlâ Türkçe yazım ve ifade hatası varsa onu da benim gözden kaçırmam olarak kabul edin lütfen. Sadece olabildiğince düzgün Tükçe yazmaya çalıştık. Zeynep'e kitabın baskıya hazır hale getirilmesindeki emeği ve Nazan'a sınırsız teknik desteği için teşekkür ediyorum.

Bu kitap, sadece kendilerinden ders aldığımız hocalarımıza değil kendilerinden çok şey öğrendiğimiz öğrencilerimize de ithaf edilmiştir.

Sevgiyle,

Yazarlar adına,

Editör, Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN, 29 Ekim 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

KONU	Sayfa
Kitap künye bilgisi	*ii*
Önsöz	*iii*
İçindekiler	*iv*
01. TEMEL BİLGİLER	**001**
01.01. Tarihçe	001
01.02. Sınıflandırma ve Adlandırma	003
01.03. Hücre Yapıları ve İşlevleri	006
01.04. Gıda Mikrobiyolojisinde Önemli Metabolik Yollar	010
01.05. Sporlanma ve Germinasyon	019
02. MİKROORGANİZMA GELİŞMESİ	**023**
02.01. Genel Bilgiler	023
02.02. Gelişme Modelleri	024
02.03. Mikrobiyel Gelişmenin Kimyasal Tanımı	028
02.04. Gelişme Eğrisi (Kurvesi)	029
02.05. Gelişme Kinetiği	032
02.06. Gelişmeye Etki Eden Faktörler	043
03. MİKROORGANİZMA İNDİRGENMESİ	**061**
03.01. Genel Bilgiler	061
03.02. Isıl İşlem	061
03.03. Asitlendirme ve Kimyasal Koruyucular	065
03.04. Işınlama	067
03.05. Membran Filtrasyon	069
03.06. Yüksek Basınç	070
03.07. Biyolojik Kontrol	070
04. BESİYERLERİ	**071**
04.01. Genel Bilgiler	072
04.02. Kısa Tarihçe	072
04.03. Besiyeri Hazırlama Şekilleri	075
04.04. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler	081
04.05. Besiyeri Çeşitleri	093
04.06. Besiyerlerinin Hazırlanması	101
04.07. Depolama	113
04.08. Çözeltilerin Hazırlanması	118
04.09. Besiyeri Kalite Kontrolü	120
04.10. Besiyeri Hataları	120
04.11. Tehlikeli Maddeler	122
04.12. Substrat Formülasyonu	124
05. STERİLİZASYON	**131**
05.01. Genel Bilgiler	131
05.02. Nemli Sıcak Uygulaması	134
05.03. Kuru Sıcak Uygulaması	142
05.04. Membran Filtrasyon	142

05.05. Kimyasal Madde ile Sterilizasyon 143
05.06. Işınlama ile Sterilizasyon 144
05.07. Sterilizasyon Kontrolü 146
05.08. Sterilize Edilmeyen Çözeltiler 147
05.09. D, z ve F Değerleri 147
05.10. Besiyeri Kısmî Sterilizasyonu 152

06. LABORATUVAR 153
06.01. Genel Laboratuvar Bilgileri 154
06.02. Laboratuvar Güvenliği 162
06.03. İzolasyon ve Tanımlama 167
06.04. Morfolojik, Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler 175
06.05. Yıkama 201
06.06. Laboratuvarda Otokontrol 203
06.07. Kültür Koleksiyonu 207
06.08. Stok Takibi ve Analiz Ekonomisi 210
06.09. Tipik Laboratuvar Hataları 214

07. GIDALARIN MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ; TEMEL İLKELER 223
07.01. Genel Bilgiler 224
07.02. Klasik Yöntemler 225
07.03. Yeni ve Hızlı Yöntemler 238
07.04. Numune Alma 241
07.05. Homojenizasyon ve Seyreltme 253
07.06. Ekim ve İnkübasyon 258
07.08. Sonuçların Verilmesi 268

08. SAYIM YÖNTEMLERİ 271
08.01. Koloni Sayımı 271
08.02. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi 277
08.03. Membran Filtrasyon 291
08.04. Metabolizmaya Dayalı Sayımlar 295
08.05. Mikroskobik Sayımlar 299
08.06. Membran Filtrasyon/ Floresan Boyama Entegrasyonu 305

09. GIDALARDA BULUNAN MİKROORGANİZMALAR 309
09.01. Genel Bilgiler 309
09.02. Saprofitler (Çürükçüller) ve Gıdaların Bozulması 313
09.03. Patojenler ve Gıda Kaynaklı Mikrobiyel Hastalıklar 314
09.04. İndikatör Mikroorganizmalar 320
09.05. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri 323
09.06. Anaeroplar ve Mikroaerofiller 324
09.07. Mayalar ve Küfler 325
09.08. Toplam *Enterobacteriaceae* 327
09.09. Koliformlar, Fekal Koliformlar ve *E. coli* 328
09.10. Enteropatojenik *E. coli* Serotipleri 331
09.11. *Salmonella* 341
09.12. *Clostridium botulinum* 351
09.13. *Clostridium perfringens* 361

09.14. *Listeria monocytogenes* ... 367
09.15. *Staphylococcus aureus* ... 375
09.16. *Campylobacter jejuni* ... 382
09.17. *Vibrio parahaemolyticus* ... 385
09.18. *Cronobacter sakazakii* ... 387
09.19. *Bacillus cereus* ... 389
09.20. *Shigella* spp. ... 391
09.21. *Yersinia enterocolitica* ... 393
09.22. Enterokoklar ... 396
09.23. *Pseudomonas* spp. ... 397
09.24. Diğer Saprofitler ... 398
09.25. Diğer Patojenler ... 402

10. MİKOTOKSİNLER ... 405
10.01. Genel Bilgiler ... 405
10.02. Mikotoksinlerin Tarihçesi ... 407
10.03. Hammaddenin Mikotoksijenik Küflerle Bulaşması ... 408
10.04. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyon Yolları ... 409
10.05. Mikotoksinlerin Canlılara Etkileri ... 410
10.06. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler ... 411
10.07. Aflatoksin ... 413
10.08. Fumonisinler ... 417
10.09. Okratoksin ... 418
10.10. Trikotesenler ... 419
10.11. Diğer Mikotoksinler ... 420

11. SU MİKROBİYOLOJİSİ ... 421
11.01. Genel Bilgiler ... 421
11.02. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik ... 421
11.03. Membran Filtrasyon ... 422
11.04. Koliform Grup Bakteriler ve *E. coli*; CCA Besiyeri ... 423
11.05. Toplam Jerm (Koloni Sayısı) ... 425

12. GIDA GÜVENLİĞİ ... 427
12.01. Genel Bilgiler ... 427
12.02. Gıda Güvenliği Yaklaşımı ... 429
12.03. Gıdalardaki Tehlikeler ... 431
12.04. HACCP ve ISO 22000 ... 435
12.05. Risk Analizi ... 438
12.06. Engeller Teknolojisi ... 440
12.07. Soğuk/ Donmuş Zincirde Kırılma ... 442

13. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLERDE METOTLARIN GEÇERLİ KILINMASI VE DOĞRULANMASI ... 445
13.01. Genel Bilgiler ... 446
13.02. Metotların Geçerli Kılınması ... 448
13.03. Metotların Doğrulaması ... 480
13.04. Numunelere Mikroorganizma İnokülasyon Yöntemleri ... 493

13.05. Geçerli Kılma ve Doğrulama Çalışmalarında Kullanılan Gıda Kategori ve Ürünleri ... 496

14. MİKROORGANİZMA ANALİZLERİ ... 501
14.01. Genel Bilgiler ... 502
14.02. Toplam Aerobik Koloni ... 503
14.03. Anaeroplar ve Mikroaerofiller ... 505
14.04. Maya ve Küf ... 507
14.05. Toplam *Enterobacteriaceae* ... 509
14.06. Koliform grup bakteriler ... 510
14.07. Fekal Koliformlar ... 513
14.08. *E. coli* (biyotip 1) ... 514
14.09. *E. coli* O157 Serotipi ... 519
14.10. *Salmonella* ... 520
14.11. *Clostridium botulinum* ... 523
14.12. *Clostridium perfringens* ve Sülfit indirgeyen Anaeroplar ... 523
14.13. *Listeria monocytogenes* ... 525
14.14. *Staphylococcus aureus* ... 528
14.15. *Campylobacter jejuni* ... 530
14.16. *Vibrio parahaemolyticus* ... 531
14.17. *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii* ... 532
14.18. *Bacillus cereus* ... 532
14.19. *Shigella* spp. ... 534
14.20. *Yersinia enterocolitica* ... 534
14.21. Enterokoklar ... 535
14.22. *Pseudomonas* spp. ... 536
14.23. Sporlu Bakteriler ... 536
14.24. Diğerleri ... 537

15. BESİYERLERİ, ÇÖZELTİLER VE DİĞER GEREÇLER ... 541
15.01. Genel Bilgiler ... 543
15.02. Seyreltme Çözeltileri ... 544
15.03. Genel Amaçlı Besiyerleri ve Çözeltiler ... 547
15.04. Toplam Aerobik Mezofilik Koloni ... 550
15.05. Anaerop Bakteriler ... 551
15.06. Maya ve Küfler ... 556
15.07. Toplam *Enterobacteriaceae* ... 558
15.08. Koliform Grup Bakteriler, Fekal Koliformlar ve *E. coli* ... 559
15.09. *E. coli* O157:H7 serotipi ... 565
15.10. *Salmonella* ... 567
15.11. *Cl. perfringens* ve Sülfit İndirgeyen Anaeroplar ... 571
15.12. *Listeria monocytogenes* ... 572
15.13. *Staphylococcus aureus* ... 577
15.14. *Campylobacter jejuni* ... 579
15.15. *Vibrio parahaemolyticus* ... 581
15.16. *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii* ... 582
15.17. *Bacillus cereus* ... 583
15.18. Enterokoklar ... 585

15.19. *Pseudomonas* spp. 586
15.20. Diğer Besiyerleri 587

16. HİJYEN ANALİZLERİ 589
16.01. Havada Mikrobiyolojik Analiz 589
16.02. Yüzey ve Sıvılarda Mikrobiyolojik Analiz 590

17. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA GÜVENLİK 595
17.01. İş Sağlığı ve Güvenliği Kavramı 595
17.02. İş Kazası ve Meslek Hastalığı 596
17.03. Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Karşılaşılan Tehlikeler ve Riskler 597
17.04. Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Karşılaşılan Tehlikeleri Önleme 608

18. KAYNAKÇA 615

İNDEKS 621
Ek A; ANALİZ YÖNTEM ÖRNEKLERİ 625
Ek B; DİĞER GÖRSELLER 639

01. TEMEL BİLGİLER

Doç. Dr. Hilal HALKMAN, Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

01.01. Tarihçe **001**
01.02. Sınıflandırma ve Adlandırma **003**
01.03. Hücre Yapıları ve İşlevleri **006**
01.04. Gıda Mikrobiyolojisinde Önemli Metabolik Yollar **010**
01.05. Sporlanma ve Germinasyon **019**

01.01. Tarihçe

Bu bölüm, mikrobiyolojinin tarihsel gelişimi üzerinde sadece basit bir bilgi vermekten ibarettir. Farklı kaynaklarda çok geniş bilgiler bulunmaktadır.

İnsanların sadece yaşadıkları çevre ile değil en azından astronomi ile ilgilenmelerinin de tarihçesi çok eski yıllara dayanır. Başta insanlar olmak üzere, hayvanlar ile bitkilerin de hastalanması ve ölmesi, bir yandan çeşitli felsefe akımlarını diğer yandan da çeşitli pagan inançlarını oluşturmuştur.

Tarihsel bir yaklaşım ile bilimin, felsefenin içinden doğup geliştiği kabul edilir. Nitekim felsefenin başlangıç döneminde filozofların tamamına yakını, bilim adamı idi. Aristoteles'e kadar felsefe ile bilimler bir birlik içinde toplanmışlardı. Felsefe kavramı hem felsefeyi hem de bilimi kapsıyordu.

Yirmi yaşından ölümüne kadar yanından ayrılmadığı Sokrates'in öğrencisi ve Aristoteles'in hocası olan Platon'un (Eflatun) kurduğu Akademi'nin kapısında yer alan "Geometri bilmeyen bu kapıdan girmesin" ifadesi, o çağlarda felsefe ile bilimin ilişkisini açıklayan en tipik örneklerden birisidir.

Platon ile Batı düşüncesinin en önemli iki filozofundan biri sayılan Aristoteles (M.Ö. 384-322) fizik, astronomi, ilk felsefe, zooloji, mantık, politika ve biyoloji gibi konularda pek çok eser vermiştir. Aristoteles tarafından ortaya atılan spontan (kendiliğinden) generasyon (abiyogenesis) teorisine göre sinek, böcek gibi küçük canlılar ve hatta balıklar, ebeveynleri olmadan çamur, kirli sular, dışkı vb. kaynaklardan oluşmaktadır.

Bu teori, 16. yüzyıl sonlarında bile geçerliliğini korumuş, Louis Pasteur (1822-1895) devrine kadar yaklaşık 2000 yıl boyunca kesin olarak reddedilememiş ve akılları karıştırmaya devam etmiştir.

Yine Aristoteles tarafından ortaya atılan "tüm göksel cisimler yerküre etrafında dairesel olarak hareket eder" şeklindeki görüş, yaklaşık 1800 yıl sonra değiştirilebilmiştir. Her ne kadar Aristoteles için biyolojiye 2000, astronomiye 1800 yıl kaybettirdiği şeklinde eleştirel bir yaklaşım varsa da bu tümüyle haksız bir yaklaşımdır.

Çünkü Aristoteles, o tarihteki olanaklar ile kendi gözlemlerine dayanan teoriler ortaya koymuş, bunları bilgi olarak kayda geçirmiştir. Oysa daha sonraki bilim insanları tam anlamı ile 1800-2000 yıl hiçbir şey yapmamışlardır. Kuşkusuz orta çağda özellikle bilim insanları üzerindeki din baskısı da ihmal edilmez.

Çoğu kaynakta mikrobiyoloji biliminin, 1660'lı yılların hemen başında Hollandalı bilim insanı Antoine (Antonie) van Leeuwenhoek tarafından mikroskop yapma çalışmalarına başlaması, sonuçta 1683 yılında iki mercek kullanarak yaptığı ve sadece 280 kez büyütebilen mikroskopta gördüğü nesneleri "çok küçük canlılar" olarak tanımlayıp bu bulgularını Royal Society'ye göndererek yayınlatması ile başladığı yazılıdır. Bununla birlikte

-Antoine van Leeuwenhoek bilim insanı değil, kumaş tüccarıdır. Mikroskop ile hobi olarak ilgilenmiştir. Kimi kaynaklar, kumaşın kalitesini kontrol etmek için mikroskobu geliştirdiğini yazar.

-Mikroskopta ilk görüntüler, 1658 yılında Athanasius Kircher tarafından bozulmuş et ve süt ürünlerindeki canlı kurtçuklara aittir. Ancak Athanasius Kircher, oldukça düşük büyütmeli mikroskobunda bakterileri görememiştir.

-Kimi kaynaklar Antoine van Leeuwenhoek tarafından geliştirilen mikroskobun büyütme gücü için "muhtemelen 300x'ten daha büyük olmayan" ifadesini kullanır.

Yukarıdaki bilgiler sadece konu üzerine küçük ilavelerdir ve sonuçta mikrobiyoloji biliminin, 1683 yılında Antoine van Leeuwenhoek tarafından geliştirilen ilk mikroskopta tükürük, yağmur suyu ve sirkedeki bakterilerin görülmesi ile başladığı kabul edilir.

Bilimin yeteri kadar gelişmediği dönemlerde insanlar "Her ne kadar çıplak gözle görülmese de hastalıkların çeşitli kurtçuklar tarafından bulaştığı" hakkında tahminler yürütüyorlardı. Nitekim

-Küflerin insan ve hayvanlarda hastalık yaptıklarına hatta sporadik[1] veya toplu ölümlere yol açtıklarına ilişkin veriler, çok eski tarihlere kadar gider. M.Ö. 600 yılında Asur tabletlerinde çavdarmahmuzu adı ile anılan *Claviceps purpurea* ergotoksinleri bulaşmış tahılların zararlı etkilerinden söz edilmiştir.

-M.Ö. 400 yılında Sparta'da ilk toplu zehirlenmeye ilişkin kayıtlar bulunmuştur. Orta çağda binlerce insan ergotizme yakalanmış, o tarihlerde Aziz Antonius humması adı verilen hastalık literatüre karıncalanma ve uyuşma semptomları gösteren sinir hastalığı olarak geçmiştir.

-Yunanlı bir fizikçi olan Galen (129-199), hastalıkların yerden buharlaşan zehirli hava ile oluştuğunu belirtmiştir.

-Bizans İmparatoru VI. Leo (886-912), o tarihte henüz botulizm olarak tanımlanmış olmasa da kan sosislerinin (kesilmiş hayvan kanından yapılan bir çeşit sosis) üretim ve tüketimini yasaklamıştır.

[1] Seyrek ve bireysel olarak görülen hastalıklar.

-Tıp ve eczacılık alanında çalışmaları olan Akşemseddin (1389-1459), Pasteur'den yaklaşık 400 yıl önce Maddet-ül-Hayat adlı eserinde mikroplardan bahsetmiştir ve hastalıkların insandan insana bulaştığını söylemiştir. Yazdığı eserde şu cümleler dikkat çekmektedir: "Hastalıkların insanlarda teker teker ortaya çıktığını sanmak hatadır. Hastalık, insandan insana bulaşmak suretiyle geçer. Bu bulaşma, gözle görülmeyecek kadar küçük, fakat canlı tohumlar vasıtasıyla olur.".

Louis Pasteur'ün (1822-1895) ve Robert Koch'un (1843-1910) mikrobiyolojiye yaptıkları katkılar burada sıralanamayacak kadar çoktur. Koch, agarı katı besiyerinde kullanarak mikrobiyolojide yeni bir çağ başlatmıştır. Pasteur, kendi adı ile anılan pastörizasyonu 1860 yılında açıklamış ve spontan generasyon teorisini 1862 yılında sonlandırmıştır.

Gıda mikrobiyolojisindeki ilk ciddi gelişme, Napolyon Savaşları (1800-1815) sırasında ordu ve uzağa sefere çıkan gemilerdeki personel için, dayanıklı gıda gereksinimi ile ortaya çıkmıştır. Her ne kadar füme et, tuzlanmış et, kurutulmuş et ile peynir ve reçel bozulmadan uzun süre dayanıklılıklarını sürdürüyorsa da, taze et ve diğer gıdaların korunması için ordu, hükümetten yardım istemiştir. Bu amaçla konulan 12.000 Frank ödülü, Nicolas Appert (1750-1841) adlı bir şekerci, ağzı kapalı cam kavanozda etleri kaynatıp, 3 ay kadar korumayı başararak almıştır. Bu ilk konserveler, İngiliz askerlerinin eline geçmiş, sonrasında giderek kemiklerin ayrılması ve teneke kutuda ısıl işlem teknikleri geliştirilmiştir.

Türkiye'de ise mikrobiyoloji alanındaki ilk çalışmalar, çiçek aşısı hazırlamak ile başlamış ve 1840 yılından sonra giderek gelişmiştir.

Pasteur, Paris Tıp Akademisi'nde 27 Ekim 1885'te verdiği "Isırıldıktan Sonra Kuduzdan Korunma" adlı bildiri ile dünyada büyük yankı yaratmıştır. Bunun üzerine, kuduz hakkındaki çalışmaları yakından izlemek amacıyla 1886 yılında Osmanlı Hükümeti tarafından desteklenen ve Tıp Fakültesi Dâhiliye Öğretim Üyesi Dr. Aleksander Zoeros Paşa başkanlığında Veteriner Hekim Hüseyin Hüsnü Bey ve Zooloji Öğretim Üyesi Dr. Hüseyin Remzi Bey'den oluşan üç kişilik bir heyet, Paris'e giderek Pasteur'ün yanında 6 ay kalmıştır.

Tıp Fakültelerinde 1891'de okutulmaya başlanan bakteriyoloji dersi, Veteriner Fakültelerine 1893'te girmiştir.

Gıda mikrobiyolojisi ise, 1967 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde Prof. Dr. Ömer Köşker tarafından kurulan Ziraat Mikrobiyolojisi Kürsüsü ile başlamıştır.

01.02. Sınıflandırma ve Adlandırma

Mikroorganizmaların keşfedilmesinden önce canlılar âlemi, "bitkiler" ve "hayvanlar" olarak sınıflandırılmış iken mikroorganizmalar ile birlikte 3 âlemde toplanmış ve bu yeni âlem, "protista" olarak adlandırılmıştır. Bitkiler ve hayvanlar

olarak yapılan ilk sınıflandırmada beslenme, şekil ve hareket farklılıkları ile bu 2 âlem çok net bir şekilde ayrılabilirken şapkalı mantarlar sadece şekil ve hareket benzerliği nedeni ile bitkiler âleminde yer almıştı. Oysa şapkalı mantarlar, beslenme açısından hiçbir şekilde bitkiler âlemi içinde yer alamaz.

Uzun süre bitkiler, hayvanlar ve protista olarak sınıflandırılan canlılar âlemi, 1969 yılında Robert H. Whittaker tarafından önerildiği şekli ile 5 âlem altında toplanmıştır. Buna göre;

1. Monera (bakteriler): Zar ile çevrili gerçek organelleri yoktur. Bakteriler ve siyanobakteriler (mavi-yeşil algler) bu gruptadır. Kitin yapıda bir hücre duvarı ve halkasal yapıda basit bir genetik materyal taşırlar, ikiye bölünerek çoğalırlar. Bu grup günümüzde "Eubacteria" ve "Archaea" olmak üzere iki alt âlemde incelenmektedir.

2. Protista (Protoctista): Bu âlem üyelerinden bazılarında kloroplastlar görülür. Protista adı altında sınıflanan bir veya çok hücreli canlılarda, doku farklılaşması görülmez. Protophyta (ilkel algler gibi bitki benzerleri), Protomycota (akışkan küfler gibi fungus benzerleri) ve Protozoa (protozoonlar gibi hayvan benzerleri) bu grupta yer alır.

3. Fungi (Mantarlar): Şapkalı mantarlar, mayalar ve küfler bu gruptadır. Sindirim enzimleri ile hücre dışı sindirim yapılır. Hücre duvarları, ağırlıklı olarak selüloz yerine kitin yapıdadır. Sınıflandırılması üzerinde yoğun çalışmalar devam etmektedir.

4. Plantae: Bitkiler âleminin üyeleri, çoğunun hücrelerinde kloroplast bulunan, ototrof (kendibeslek) canlılardır. Hücre duvarları selüloz yapıdadır. Klorofil taşımayan ve fotosentez yapmayan bitki türleri de bulunmaktadır.

5. Animalia: Hayvanlar âlemine giren bu canlılarda kloroplast bulunmaz. Besin, sindirildikten sonra hücre içerisine alınır. Heterotrof (dışbeslek) beslenme şekli gösterirler.

Carl Woese, 1990 yılında canlıları hücre yapılarına göre öncelikli olarak 3 gruba ayıran bir sistem önermiş ve "domain" adı verilen yeni bir taksonomi birimi kullanmıştır. Âlemden daha yüksek kabul edilen bu birim temeline göre canlılar, "Bacteria", "Archaea" ve "Eucarya" gruplarında toplanır. Woese, genel olarak çalışmalarını ribozomal RNA üzerinde yürütmüş ve RNA yapısına göre akrabalık derecelerini ortaya koymayı hedeflemiştir.

Canlılar ve cansızlar arasında geçiş olarak kabul edilen virüslerin bu sınıflandırmalarda yeri yoktur, ancak kendi içlerinde sınıflandırılırlar. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 1990'ların başında virüslerin adlandırılması ve sınıflandırılması için çeşitli kurallar geliştirerek uygulamaya koymuştur. Günümüzde de virüs türlerinin adlandırılması ve bu sistem içinde yerleştirilmesi, bu kurallara uygun şekilde devam etmektedir.

Canlıların sınıflandırılmasında ve adlandırılmasında İsveçli bilim insanı Carl Linnaeus (1707-1778) tarafından geliştirilen sistem, bugün de kullanılmaktadır.

Buna göre her canlı türü iki kelimeden oluşan cins ve tür adı ile tanımlanır. Benzer türler, aynı cins altında; benzer cinsler, aynı familya altında; benzer familyalar, aynı takım altında; benzer takımlar, aynı sınıf altında; benzer sınıflar, aynı şube altında ve benzer şubeler, aynı âlem altında toplanır.

Adlandırmada yaygın kullanılan sistemde cins ismi büyük harfle, tür ismi küçük harf ile başlar. *Salmonella* serotipleri hariç olmak üzere tümü italik olarak yazılır. Cins ve tür isimlerinin büyük çoğunluğu Latincedir ve cins ile tür isminden mikroorganizma hakkında bilgi alınabilir. Örneğin, *Streptococcus thermophilus*; zincir şeklinde (Strepto), yuvarlak (coccus), sıcağa (thermo) dayanıklı (philus).

Bazen mikroorganizmayı ilk olarak bulan/ tanımlayan kişinin adı verilir: *Escherichia coli*, Theodor von Escherich tarafından izole edilmiştir. İlk kez Daniel Elmer Salmon tarafından izole edilen bakteri *Salmonella* olarak adlandırılmıştır.

Cronobacter sakazakii ise adını, her çocuğunu doğar doğmaz yutan Yunan mitolojisi titanı Cronos ve Japon mikrobiyoloğu Riichi Sakazaki'den alır.

Bazen bakteri isimleri alt türleri ile ifade edilir. Örneğin, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*. Bu bakterinin önceki ismi *Streptococcus diacetylactis* olup arama motorlarında bu isimle de bulunabilmektedir. Benzer şekilde doğrudan *Lactococcus diacetylactis* adı ile yazılmış makalelere de arama motorlarından erişilebilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, subsp., spp., ssp., serotype ve biovar ifadelerinin italik yazılmamasıdır.

Salmonella cinsinde adlandırma farklıdır ve türler değil, serotipler[2] önemlidir. Buna göre bakterinin tam adı *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* iken kısaca *Salmonella* Enteritidis olarak yazılır. Burada Enteritidis büyük harfle başlar ve italik yazı kullanılmaz. Bunun nedeni tür olmadığının ifadesidir.

Adlandırmada kullanılan bir diğer kural, familya isminin sonuna …*aceae* (örneğin *Enterobacteriaceae*), takım sonuna …*ales* (örneğin *Enterobacteriales*) son eklerinin yazılmasıdır.

Funguslarda sınıf isminin sonuna …*mycetes* (örneğin *Deuteromycetes*) ve şube isminin sonuna …*mycota* (örneğin *Amastigomycota*) son ekleri yazılır.

Moleküler tekniklerin gelişmesine bağlı olarak, mikroorganizmaların sınıflandırılması hatta adlandırılmasında dahi değişiklikler görülmektedir ve ileride de değişiklikler olacağı açıktır. Örneğin öncesinde *Enterobacter sakazakii* olarak adlandırılmış olan bakterinin yeni ismi *Cronobacter sakazakii* olmuştur.

[2] Serotip, mikroorganizmalarda (özellikle bakterilerde) serolojik yöntemlerle ayrılabilen, alt tür düzeyindeki sınıflandırmayı gösterir. Tür düzeyinde ortak antijenlere sahip mikroorganizmalar serovar, serotip ya da serogrup olarak adlandırılır.

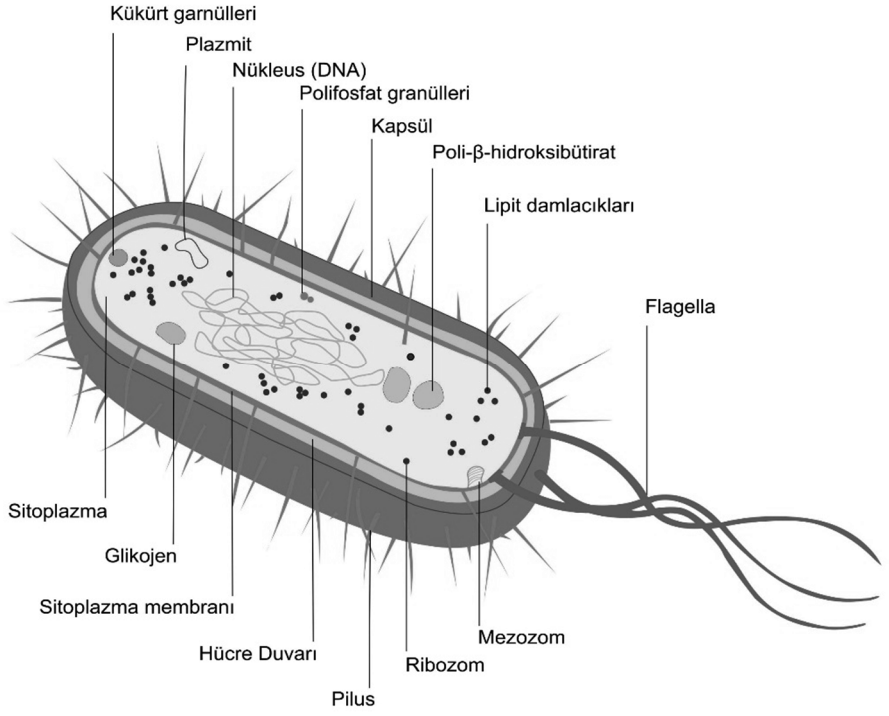
01.03. Hücre Yapıları ve İşlevleri

Bu bölümde olabildiğince kısa, ancak gıda mikrobiyolojisini ilgilendirdiği düzeyde bilgi verilmiştir. Hücre yapıları ve işlevleri (fonksiyonları) konusu, çeşitli üniversitelerde yüksek lisans/ doktora dersi olarak verilmektedir.

Bütün canlı organizmalar, hücrelerden oluşmuştur ve hücreler, en küçük canlı birimlerdir. Yapısal olarak prokaryot ve ökaryot olarak sınıflandırılır.

Prokaryotik Hücreler

Tipik bir bakteri hücresi şekil 01.01'de verilmiştir.



Şekil 01.01. Bakteri hücresi (Prof. Dr. Nezihe Tunail, Mikrobiyoloji; 2009 künyeli kitaptan, yazarın izni ile kullanılmıştır.)

Prokaryotik canlılar denildiğinde asıl olarak bakteriler ve siyanobakteriler (mavi-yeşil algler) anlaşılır. Bu bölümde sadece bakteriler verilmiştir. Bakteriler tek hücrelidir. Yaklaşık 0,5-1,0 x 2,0-10 µm boyutlarında ve genel olarak kok (sferik, küresel), basil (çubuk), kıvrımlı (tirbuşon görünümünde) ve kavisli (virgül) şekildedir.

Mikroskopta koklar tekli (monokok), ikili (diplokok) zincir (streptokok), dörtlü gruplar (tetrat), balya (sarsina) ya da üzüm salkımı (stafilokok) şeklinde basiller

ise tekli ya da zincir (streptobasil) şeklinde görülebilirler. Bazı çubuk bakterilerin eni boyuna yakın (kokobasil) olduğu için mikroskopta kok mu basil mi oldukları kolaylıkla ayırt edilemez. Besin maddeleri, moleküler veya iyonik formda birkaç özel mekanizma kullanılarak membran aracılığı ile dış çevreden hücre içine taşınır.

En dışta murein ile kuvvetlendirilmiş hücre duvarı, altında hücre membranı (hücre zarı) ve bunun içinde çeşitli hücre yapıları vardır.

Hücre duvarı, mureinden oluşmuştur. Glikoprotein (peptidoglikan), protein-karbohidrat kompleksi yapısındadır. Gram boyama sonucunda ayırt edilebilen 2 çeşit hücre duvarı vardır.

Hücre membranı, fosfolipit ve proteinlerden oluşmuştur ve ökaryot hücrelerdekine benzerlik gösterir. Membran aynı zamanda enerji üreten bileşenleri de içerir.

Gram pozitif bakteriler, kalın hücre duvarına sahiptir. Gram boyama sonucunda mor renkli görülürler. Sporlara sahip olabilirler, penisilin ve lisozim enzimine karşı duyarlıdırlar. Gram negatif bakterilerde dışta lipit tabakası bulunan ince bir hücre duvarı vardır ve Gram boyama sonucunda hücreler pembe renkte görülürler. Gram negatif bakteriler içinde, spor oluşturan nadir türler vardır.

Membranın içi, genel olarak sitoplazma olarak adlandırılır. Metabolik yollar için gerekli bütün enzimleri içerir. Genetik materyal, ribozom ve mezozom ile nişasta ve glikojen olarak depo maddeleri, sitoplazma içinde yer alır. Ribozomlar, protein sentezinden sorumludur. 70S[3] tipindedirler. Mezozom, fotosentez ve solunum için gerekli olan membrana bağlı bütün proteinleri içeren ve membranın sıkıca katlanmış bölgesidir.

Prokaryot hücrede, DNA ve plazmit olmak üzere iki farklı genetik materyal bulunur. DNA, ökaryot hücreden farklı olarak, çekirdek zarı ile çevrelenmiş değildir ve dairesel yapıdadır. Kromatin oluşturmak için herhangi bir proteine bağlı değildir. Buna "bakteri genomu" da denilir. Plazmitler, genomik DNA'dan bağımsız, dairesel DNA parçacıklarıdır. Genelde antibiyotik dirençlilik genlerini içerir. Hücre bölünmesinde bunlar da ikiye bölünerek yeni iki hücreye giderler. Bakteri hücreleri arasında DNA değişimini sağlar.

Bazı bakterilerde dışarıda kapsül ve flagellum ($\Rightarrow$ çoğulu flagella) ve pili (pilus; fimbria[4]) bulunur.

Bazı bakterilerde bulunan kapsül, hücre duvarının dışındaki kalın polisakkarit tabakasıdır. Hücrelerin yapışarak bir arada tutulmasını sağlar. Gıda rezervi

[3] S (Swedberg ünitesi): Santrifüjlemede, bir molekülün büyüklüğüne ve biçimine bağlı olan çökme sabitidir. 1S birimi, 10-13 saniyedir.

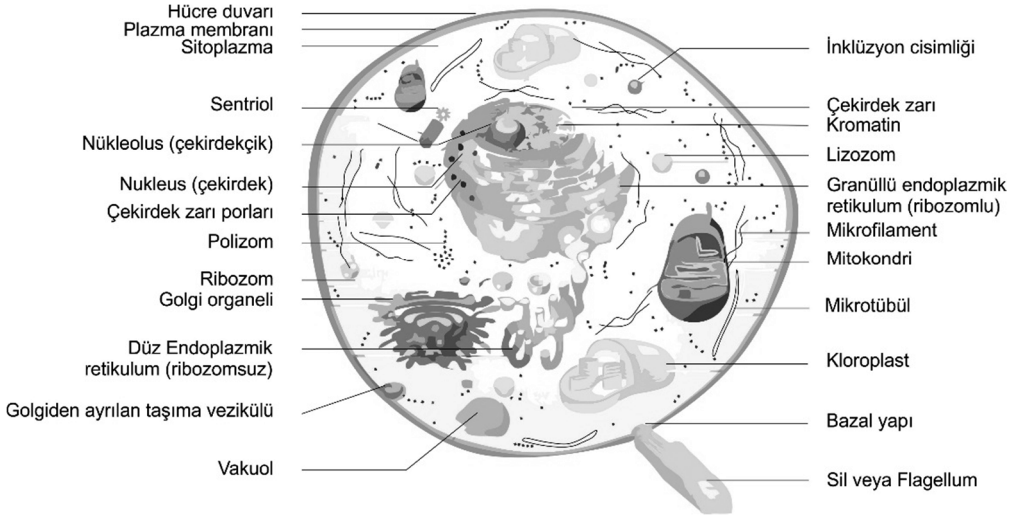
[4] Kimi Türkçe kaynaklarda "fimbriae" olarak geçer.

olarak görev yapar. Hücreyi kimyasalların olumsuz etkisinden ve kurumaya karşı korur, ayrıca fagositoza karşı da koruyucudur.

Flagella, hareket organelidir. Bazı bakterilerde flagella yoktur ve dolayısı ile bunlar hareketsizdir. Flagella, farklı sayılarda olabilir. Pilus (fimbria) ise flagellaya benzer yapıda, bakteri hücrelerine bağlı olan kıl benzeri ve oldukça kısa ve flagelladan ince flamenttir. Hareketli ve hareketsiz bakterilerde rastlanabilmektedir. Her bir fimbria, protein yapısındadır. Genellikle Gram negatif bakterilerin çoğunun yüzeyinde bulunurken, Gram pozitif bakterilerde nadiren görülür. Gram negatif bakterilerde fimbria, hücre-hücre ya da hücre-yüzey yapışmasında rol alır.

Ökaryotik Hücreler

Tipik bir ökaryotik hücre şekil 01.02'de verilmiştir.



Şekil 01.02. Ökaryotik hücre (Prof. Dr. Nezihe Tunail, Mikrobiyoloji; 2009 künyeli kitaptan, yazarın izni ile kullanılmıştır.)

Ökaryotik hücreler olarak bu bölümde sadece maya ve küfler ele alınmıştır.

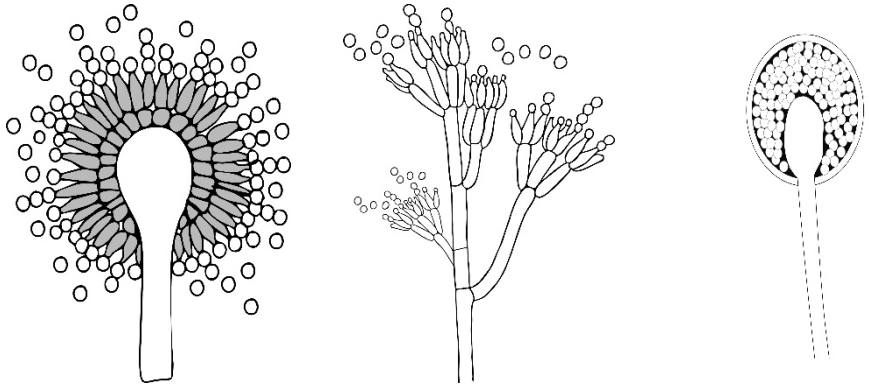
Mayalar tek hücreli iken, küfler çok hücrelidir. Ökaryotik hücreler prokaryotik hücrelerden daha büyüktür. Ökaryotik hücreler 20x100 µm iken prokaryotlar 1x10 µm büyüklüğündedir. Ökaryotik hücreler, hücre duvarı ve ince plazma membranına sahiptir. Hücre duvarı mukopeptit içermez ve karbohidratlardan oluşmuştur. Plazma membranı, sterol içerir. Mitokondri ve vakuol gibi organelleri içeren sitoplazma, membran ile bağlıdır. Hücreler eşeyli olmayan çoğalmada mitoz ile eşeyli çoğalmada ise mayoz ile çoğalır.

Mayalar, hareketsiz olup doğada çok yaygındırlar. Hücreler, mikroskopta genellikle oval şekilde görülür. Hücre duvarları polisakkaritlerden (glikan), protein ve lipitlerden oluşmuştur. Tomurcuklanarak çoğalan mayaların hücre

duvarında tomurcuklanma izleri görülebilir. Membran, hücre duvarına bitişiktir. Sitoplazma, ribozom ve organellerden kaynaklanan ince granüler bir görüntüye sahiptir. Çekirdek, nükleer membran ile çevrilmiştir.

Küfler hareketsiz, flamentli ve dallıdır. Hücre duvarı; selüloz, kitin veya her ikisinden oluşmuştur. Küfler, hif adı verilen çok sayıdaki flamentlerden oluşur. Hiflerin birleşmesiyle miseller meydana gelir. Hifler septalı (bölmeli) ya da septasız (bölmesiz) olabilir. Vejetatif hifler substrattan besin maddelerini alırken yukarı doğru uzayan förtil hifler çoğalmadan sorumlu sporları taşırlar.

Şekil 01.03'te çeşitli küflerin mikroskobik görüntüleri verilmiştir.



Şekil 01.03. Çeşitli küf cinslerinin mikroskobik görüntüsü

-Hücre membranı veya plazma membranı, fosfolipit ve proteinlerden oluşan, hücre dışını çevreleyen ince elastik tabakadır. Hücre bileşenlerini çevresinden ayırır. Hücre içine madde giriş ve çıkışlarını kontrol eder.

-Sitoplazma (Cytosol), hücre membranı içindeki sıvıdır. Glikoliz ve diğer metabolik yollarda, gerekli enzimler ile hücrenin işlevleri için gerekli bütün bileşenleri içerir.

-Çekirdek (nükleus), en büyük organeldir. Çekirdekten mRNA ve ribozomların çıkışını kontrol eden proteinleri içeren ve geniş boşlukları olan çekirdek zarı ile çevrilidir. Çekirdeğin iç kısmına nükleoplazma denilir ve kromatinleri bulundurur. Kromatinler, genleri içeren DNA/ protein kompleksidir. Çekirdekçik, çekirdek içinde koyu bir bölgedir. Ribozomların sentezlenmesinde ve m-RNA ile ilgili işlerde görev alır.

-80S ribozomlar, hücrede en küçük ve çok sayıda bulunan organeldir. Protein sentezinde görev alırlar. Protein ve RNA'dan oluşurlar ve çekirdekçikte üretilirler. Hücrede ya serbest halde bulunur ya da daha yaygın şekli ile granüllü endoplazmik retikuluma bağlıdırlar. Ribozomlar, sık sık gruplar halinde bulunur. Bu gruplara polizom adı verilir. Ökaryotik ribozomlar, prokaryot hücrelerindekilere kıyasla daha büyüktür.

-Endoplazmik retikulum, moleküllerin bir yerden diğer bir yere geçişine izin veren membran kanallarının toplandığı önemli taşıma (transport) yoludur. Çekirdeğin dış membranına bağlıdır ve protein sentezinde rol oynayan önemli bir kısımdır. Granüllü ve düzgün endoplazmik retikulum olmak üzere iki çeşittir. Granüllü endoplazmik retikulum, 80S ribozomları taşıması nedeniyle pürüzlü görünür. Düzgün endoplazmik retikulum, ribozom içermez. Hücre tarafından gereksinilen lipit ve glikoprotein gibi maddelerin taşınmasını sağlayan kanallardan oluşmuştur.

-Golgi cisimciği, düzleşmiş membran keseciklerinin oluşturduğu bir organeldir ve endoplazmik retikulumdan oluşur. Pürüzlü endoplazmik retikulumda bulunan proteinleri hücre membranına taşır.

-Vakuol, seyreltme sıvısı içeren membrana bağlı keseciklerdir. Birçok hücre, gerektiğinde oluşan küçük vakuollere sahiptir. Bazı tek hücrelilerde de vakuol bulunur. Besin maddelerinin parçalanmasında, suyun uzaklaştırılmasında ve ozmotik dengenin düzenlenmesinde görev alır.

-Lizozom, sindirim enzimlerini içeren ve membrana bağlı keseciklerdir. İstenmeyen toksin, kimyasal, organel veya hücrenin kendisinin yıkımında kullanılır. Hücre ölümünden (otoliz) sorumludur.

-Sentriol, hücre bölünmesine katılan kısa mikrotübüllerden oluşan bir dizidir. Her hücre bölünmesinden önce sentrioller ikiye bölünür. Oluşan iki sentriol, kromozomları ayıran ve organize eden kromozomların bağlandığı lifleri oluşturarak hücrenin iki zıt ucuna hareket eder.

-Hücre duvarı, hücre membranı dışındaki kalın tabakadır. Hücreye dayanıklılık ve sertlik kazandırır. Hücre duvarı, fibrillerden oluşur ve çözünmüş maddeler için geçirgendir. Fungal hücrelerde hücre duvarı kitinden oluşmuştur.

01.04. Gıda Mikrobiyolojisinde Önemli Metabolik Yollar

Mikroorganizmalar, enerji ve hücresel materyalleri üretmek ve çoğalabilmek için, ortamda bulunan bazı bileşenleri metabolize ederler. Bakteriyel gelişme Gram pozitiflerde besin maddelerinin sitoplazma veya sitoplazmik membranda, Gram negatiflerde ise periplazmik boşlukta metabolize edilmesi ile sağlanır. Bu işlem, makromoleküllerin enzimatik yolla parçalanmasından sonra küçük moleküllerin hücre duvarı veya hücre membranı aracılığıyla hücre içine taşınması, enerji üretmek için küçük moleküllerin yıkımı, hücrenin işlevsel ve yapısal bileşenlerinin sentezi ve kullanılmayan ürünlerin ortama salınması aşamalarını içermektedir. Ayrıca hücresel materyallerin yenilenmesi, çevresel strese uyum sağlama, hasar görmüş yapıların onarılması ve hücresel farklılaşma metabolik işlemler aracılığı ile gerçekleşir. Bu nedenlerle temel metabolizma bilgisi gıda mikrobiyolojisinde önemlidir.

"01.03. Hücre Yapıları ve İşlevleri" bölümünde olduğu gibi bu bölümde de sadece temel bilgiler verilmiştir. Mikrobiyel metabolizma konusu da çeşitli üniversitelerde yüksek lisans/ doktora dersi olarak verilmektedir.

Enerji üreten metabolik yollar, mikrobiyel hücreler tarafından hücre yapılarının sentezinde kullanılan veya ortama salgılanan birçok metabolik ürünü de üretir. Bu metabolitlerin yapısı, kullandıkları substratların yapısına, mikroorganizmanın aerobik veya anaerobik oluşuna ve ortamda oksijen varlığına bağlıdır. Metabolizmada son ürün olarak üretilen ve daha fazla gerekli olmayan bazı ürünler ortama salgılanır. Kontrollü şartlarda gerçekleştirilen biyoproses veya fermantasyon sonucu oluşan metabolizma ürünleri fermente gıdalarda yapı, tat, koku ve uzun raf ömrü gibi istenen özellikleri kazandırması açısından önemlidir ve tüketici tarafından tercih edilmektedir. Mikrobiyel metabolik ürünler örneğin, enzimler gıdaların işlenmesinde, bakteriyosin ve organik asitler gıdanın korunmasında, dekstran yapıyı geliştirme ve diasetil aroma amaçlı kullanılmaktadır. Biyoproses veya fermantasyon sonucunda oluşan bazı ürünler, saflaştırılıp gıda katkısı olarak da kullanılabilmektedir. Bazen de mikrobiyel faaliyet sonucunda oluşan ürünler, gıdanın bozulmasına ve sağlık riski oluşturmasına neden olur. Gıdanın saprofitler tarafından bozulması ve patojenlerin ürettiği toksinler, mikrobiyel metabolizma ve gelişme ile doğrudan ilgilidir.

Gıdadaki gelişme süresince mikroorganizmalar enerji üretirler ve hücre yapılarını sentezlerler. Üretilen enerjinin büyük bir kısmı, hücresel bileşenlerin sentezi için kullanılır. Enerji üreten tepkimeler (reaksiyonlar) ile hücresel materyallerin sentezlendiği tepkimeler birbirleriyle bağlantılıdır.

Üretilen enerji ya doğrudan endergonik[5] tepkimelerde kullanılır ya da daha sonraki tepkimelerde kullanılmak üzere depolanır. Enerji, enerjice zengin (nukleotit trifosfatlar, inorganik fosfatlar, vb.) ara ürünler ve karboksilik asitlerin türevleri (asetil KoA) oluşturularak depolanabilir. Bu ürünlerden en önemlisi adenozin trifosfattır (ATP). Adenozin difosfattan (ADP) ya oksidatif fosforilasyon veya substrat fosforilasyonu ile oluşur.

Metabolizma, hücre içine alınan maddelerin değişimi, dönüşümü veya hücrede meydana gelen tüm tepkimelerin toplamı olarak tanımlanır. Bütün bu tepkimeler ise katabolizma (parçalanma, dissimilasyon) ve anabolizma (sentez olayları, assimilasyon) olarak iki başlık altında toplanır. Katabolizmada büyük ve kompleks moleküller, daha küçük ve basit moleküllere parçalanır, enerji açığa çıkar ve ara ürünler oluşur. Açığa çıkan enerji anabolizmada kullanılır. Anabolizmada basit moleküllerden kompleks moleküller sentezlenir.

Mikroorganizmalar, enerji kaynaklarına göre fototroflar (güneşten gelen radyant enerjiyi kullananlar), kemoorganotroflar (indirgenmiş organik molekülleri

[5] Endergonik: Reaksiyonun gerçekleşmesi için enerji gerekmesi.

yükseltgeyerek enerji elde edenler) ve kemolitotroflar (indirgenmiş inorganik molekülleri yükseltgeyerek enerji elde edenler) olmak üzere üçe ayrılırlar.

Mikroorganizmalar sadece enerji kaynaklarına göre değil elektron akseptörlerine (alıcılarına) göre de çeşitlilik gösterirler. Enerji kazanımı sırasında üretilen elektronlar ($H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$), daha sonra oksidasyon (yükseltgenme) elemanı olarak görev yaparlar.

Kemoorganotroflar son elektron akseptörü (alıcısı) olarak;

-Fermantasyon yapanlar (endojen organik maddeleri kullananlar),

-Aerobik solunum yapanlar (oksijeni kullananlar),

-Anaerobik solunum yapanlar (nitrat, sülfat, CO_2, fumarat vb. maddeleri kullananlar) olmak üzere üç alt grupta toplanırlar. Kemolitotroflar inorganik elektron akseptörü olarak O_2, sülfat, nitrat vb. maddeleri kullanırlar.

Fermantasyon, organik moleküllerin hem elektron donörü (vericisi) hem de elektron akseptörü (alıcısı) olarak faaliyet gösterdiği bir enerji üretim şeklidir. Solunumda ise inorganik moleküller, elektron akseptörü olarak kullanılarak enerji üretilir. Aerobik solunumda oksijen, anaerobik solunumda ise inorganik bileşikler, elektron akseptörü olarak kullanılır. Kemolitotroflarda ise elektron donörü ve elektron akseptörü, inorganik bileşiklerdir.

Gıda sistemlerinde metabolize edilebilen substratlar; karbohidratlar, proteinler ve lipitlerdir. Gıdalardaki önemli mikroorganizmalar, organik karbon kaynağına gerek duyan heterotrof ve enerji üretmek için elektron donörü olarak organik bileşikleri kullanan kemoorganotrof gruplardır.

Genel olarak mikroorganizmalar karbohidratları, protein ve lipitlere göre daha kolay metabolize ederler. Gıdalarda karbohidrat ve proteinin her ikisi de zengin ise, mikroorganizma önce karbohidratları kullanır, asit oluşur ve pH değeri düşer. Düşük pH değerinde proteinler parçalanamaz. İşlenmiş et ürünlerinin formülasyonuna eklenen karbohidrat bu faydayı sağlamaktadır.

Karbohidratlar ve diğer besin maddelerinin, heterotrof mikroorganizmaların katabolizmasında iki önemli işlevi vardır. Birinci fonksiyonlarında bunlar okside olur ve enerji üretirler. İkinci fonksiyonlarında ise, yeni hücre bileşenlerinin sentezi için karbon kaynağı ve yapıtaşı sağlarlar.

Besin Maddelerinin Hücre İçine Taşınması

Mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için hücrenin gelişmesi, çoğalması ve kompleks bileşenleri sentezleyebilmeleri gerekir. Bu kimyasal işler için hem enerjiye hem de küçük ve basit moleküllere gerek duyulur. Beslenme için yararlı besin molekülleri ile iyonların hücre içine taşınması ve hücre içinde biriken metabolitler ile iyonların dışarı çıkartılması zorunludur.

Hücrenin ozmotik bariyerini oluşturan membran, hücre içi ile dış ortam arasındaki madde giriş ve çıkışlarını kontrol altında tutan bir işleve sahiptir.

Hücre içine gerekli maddeleri alırken, hücre için gerekli olmayan maddelerin geçişine izin vermez. Bir diğer deyiş ile seçici geçirgenliğe sahiptir. Bu seçici geçirgenlik, membran çift lipit tabakası içinde bulunan substratlara özgü permeazlar ve aktif taşıma sistemi ile gerçekleştirilir.

Hücre içine girişi kontrol eden üç farklı taşıma sistemi vardır. Pasif taşımada (kolaylaştırılmış difüzyon) molekül, yüksek derişimden düşük derişime doğru hareket eder. Önemsiz bir etkiye sahip olduğu için mikroorganizmalarda yaygın kullanılmayan bir taşıma yoludur. Aktif taşımada moleküller, sitoplazmada kimyasal olarak değişmemiş biçimde, yüksek derişimde birikebilir. Aktif taşımada enerjiye gerek vardır. Bu taşıma şekli, iyon gradiyenti veya ATP hidrolizinden elde edilen enerjiye bağlıdır. Grup translokasyonunda (fosfotransferaz sistemi) fosforilasyon ile değişmiş substratlar, hücre içine substratlara özgün proteinler ile taşınırlar. Fosfotransferaz sistemi, en çok çalışılmış translokasyon sistemidir ve taşıma süresince fosfatlanmış glikoz, mannoz, fruktoz, α-asetilglukozamin ve β-glukositlerin taşınmasını sağlamaktadır.

Mikroorganizmalar hücre dışındaki polisakkaritleri amilaz, selülaz ve pektinaz gibi hidrolitik enzimler ile mono ve disakkaritlere ayırırlar. Benzer şekilde, proteinler proteolitik enzimler (proteazlar) ile küçük moleküllü polipeptit ve aminoasitlere, lipitler ise hücre dışı hidrolitik lipazlar ile parçalanarak yağ asitleri ve gliserole dönüştürülerek hücre içine alınırlar.

Genel olarak mono ve disakkaritler, aminoasitler ve 8-10 aminoasit içeren peptitlere kadar olan moleküller, hemen hemen hiçbir değişime uğramadan tek ya da gruplar halinde özel taşıma sistemleri ile hücre içine taşınır. Yağ asitleri, serbest ya da gliseritlerin hidrolize olmuş biçiminde çözünür veya çift lipit tabakası aracılığı ile difüze olabilir. Nişasta gibi büyük moleküllü karbohidratlar, peptitler ve kazein ile albümin gibi proteinler doğrudan hücre içine taşınamazlar. Eğer hücre, hidrolizi sağlayan ve hücre duvarının yüzeyinde bulunan veya ortama salgılanan hücre dışı spesifik enzimleri üretebilme yeteneğinde ise bu büyük molekülleri küçük moleküllere parçalar ve uygun taşıma sistemi ile hücre içine alır.

Moleküllerin geçişi derişim farkına, iyonların geçişi ise elektropotansiyel farklılığa dayanır. Bununla birlikte aktif taşımada ve grup translokasyonunda enerjiye mutlak gerek duyulur.

Gıdalardaki Karbohidratların Kullanımı

Karbohidratlar; monosakkarit (tetroz, pentoz, hegzoslar), disakkarit ve polisakkaritleri içeren geniş bir kimyasal gruptur. Enerji üretim kaynağı olarak en fazla karbohidratlar tercih ediliyor olmasına rağmen mikroorganizmaların karbohidratları parçalama yetenekleri büyük farklılık gösterir. Hücre dışında bulunan mono ve disakkaritler, hücre içine genellikle bu şekilde alınır ve disakkaritler monosakkaritlere hidrolize edilir (parçalanır). Polisakkaritler ise hücre içine taşınmadan ve kullanılmadan önce alfa amilaz gibi hücre dışı

enzimler ile mono ve disakkaritlere parçalanır. Monosakkaritler daha sonra farklı metabolik yollar aracılığı ile daha ileri boyutta parçalanır.

Polisakkaritlerin Parçalanması

Küfler; bazı *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. ve diğer birkaç bakteri türü nişasta, glikojen, selüloz, pektin ve diğer polisakkaritleri hücre dışı enzimler aracılığı ile parçalayabilir. Parçalanma sonucu oluşan mono ve disakkaritler, hücre içine taşınır ve burada metabolize edilir. Meyve ve sebzelerde, özellikle pektin ve selüloz gibi polisakkaritlerin mikroorganizmalar tarafından yıkımı, bitkinin yapısını olumsuz şekilde etkiler ve kalite kaybına yol açar.

Disakkaritlerin Parçalanması

Gıdalardaki disakkaritler ya gıdada mevcuttur (laktoz, sakkaroz) ya da nişastadan maltozun oluşmasında olduğu gibi parçalanma sonucunda meydana gelir ve enzimler tarafından hücre içinde monosakkaritlere hidrolize edilirler. Örneğin, laktoz, laktaz (β 1-4 galaktosidaz) enzimi ile glikoz ve galaktoza; sakkaroz, sukraz enzimi ile glikoz ve fruktoza; maltoz ise maltaz enzimi ile 2 molekül glikoza hidrolize edilir.

Monosakkaritlerin Parçalanması

Monosakkaritler, çeşitli ara ve son ürün üreten birkaç metabolik yolda aerobik, fakültatif anaerobik ve anaerobik mikroorganizmalar tarafından katabolize edilirler. Metabolik yollar, monosakkaritlerin çeşit ve miktarına, mikroorganizma tipine ve sistemin redoks potansiyeline bağlıdır. Gıdalardaki bütün önemli mikroorganizmalar, glikozu metabolize edebilmelerine rağmen fruktoz, galaktoz, tetroz ve pentozları kullanabilme yetenekleri birbirinden çok farklıdır.

Mikroorganizmalar birkaç metabolik yol ile glikoz ve diğer şekerleri katabolize eder. Metabolizmada en yaygın olarak kullanılan 3 önemli yol vardır:

-Embden Meyerhoff Parnas (Glikoliz) EMP,

-Pentoz Fosfat (PP),

-Enter (Entner) Doudoroff (ED).

Bu üç yolda glikozdan farklı tepkimelerle gliseraldehit-3-fosfat (GAP) oluşturulur. GAP, üç yolda da aynı reaksiyonlarla kilit ürün olan pirüvik aside dönüşür ve daha sonra pirüvik asit, fermantasyon veya aerobik solunum ya da anaerobik solunum ile metabolize edilir.

Embden Meyerhoff Parnas (EMP) Yolu

Katabolizmanın ikinci aşaması olan glikozun pirüvata parçalanmasında, oksijen varlığında ya da yokluğunda bütün önemli mikroorganizma gruplarının yaygın olarak kullandığı yoldur. Glikoliz iki aşamada oluşur. Birinci aşamada glikoz iki kez fosfatlanır ve 1-6 fruktoz di-fosfat oluşur. Bu aşamada enerji kazanılmaz,

2 ATP harcanır. Glikolizin ikinci aşamasında gliseraldehit-3-fosfat oluşur ve 5 aşamada pirüvata dönüşür. Glikozdan kilit ürün olan 2 molekül pirüvat oluşur.

$Glikoz + 2ADP^{3-} + 2Pi^{2-} + 2NAD^{+} \rightarrow 2Pirüvat + 2ATP^{4-} + 2NADH + 2H^{+} + 2H_2O$

Glikozfosfat → Fruktozdifosfat → 2Pirüvat

Laktat fermantasyonu; Pirüvat → Laktat

Alkol fermantasyonu; Pirüvat → Asetaldehit → Etilalkol + CO_2

NAD; nikotinamit adenin dinukleotit

NADP: nikotinamit adenin dinukleotit fosfat

Enter (Entner) Doudoroff (ED) Yolu

Sadece prokaryotlarda bulunan ve karbohidratların yıkımında, EMP'den sonra ikinci önemli yoldur. ED yolu, aerobik Gram negatif bakterilerde yaygındır ve en yaygın olarak *Pseudomonas* spp. tarafından kullanılır. ED yolu, pentoz fosfat yolundaki gibi aynı tepkime ile başlar. Glikoz-6-fosfat, 6-fosfoglukonat'a dönüşür ve 6-fosfoglukonat'tan 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat (KDPG) ve KDPG'den pirüvat ve gileseraldehit-3-fosfat oluşur. Glikoz, pirüvata parçalandığında her glikoz molekülünden 1 ATP + 1 NADPH + 1 NADH oluşur.

$Glikoz + NADP^{+} + NAD^{+} + ADP + P_i^{2-} \rightarrow$
$2\ Pirüvat^{-} + NADPH + NADH + 3H^{+} + ATP$

Pentoz Fosfat (PP) Yolu

Bakterilerde glikozun %80'i aerobik olarak EMP ve ED yolu ile parçalanır, yaklaşık %20'si ise ATP üretimi, NADPH'ın rejenerasyonu, nükleotit ve aminoasit biyosentezinde gerekli öncü bileşenlerin sentezi için PP yolu ile parçalanır. Aerobik ve anaerobik şartlar altında gerçekleşir. PP yolu, biyosentezde daha önemlidir. Pentoz fosfat yolu, ED yolunda olduğu gibi glikoz-6-fosfatın 6-fosfoglukonata fosfatlanması ile başlar.

Pentoz fosfat yolu çeşitli katabolik ve anabolik işlevlere sahiptir.

-Pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH, biyosentez süresince moleküllerin indirgenmesinde elektron kaynağı olarak görev yapar.

-Pentoz fosfat yolu ile 4C'lu ve 5C'lu şekerler sentezlenir. 4C'lu şeker olan eritroz-4-fosfat vitamin B_6 ve aromatik aminoasitlerin riboz-5-fosfat ise nükleik asitlerin ana bileşenidir. Mikroorganizma gelişirken pentoz fosfat yolu aynı zamanda hegzos (6C'lu) üretimi için gereken karbonu sağlar. Glikoz, peptidoglukan sentezi için gereklidir.

-Pentoz fosfat yolunda oluşan ana ürünler, ATP üretiminde kullanılır. Pentoz fosfat yolunda oluşan Gliseraldehit-3-fosfat, glikolitik yoldaki gibi pirüvata ve ATP'ye dönüşür ve sonrasında, daha fazla enerji kazandıran TCA (Krebs, trikarboksilik asit veya sitrik asit siklusu) döngüsüne bağlanır.

Ayrıca NADPH, NADH'e dönüşür, elektron taşıma zinciri tarafından okside edildiğinde ATP üretir. Pentoz fosfat yolu ile birçok mikroorganizma enerji kazandığı gibi bu yol biyosentezde çok daha önemlidir.

$$Glikoz + ATP^{4-} + 2NADP^{+} + H_2O \rightarrow Pentoz\text{-}5\text{-}P^{2-} + CO_2 + ADP^{3-} + 2NADPH + 3H^{+}$$

Pentoz fosfatlar daha sonra hegzos fosfat ve gliseraldehit-3-fosfata dönüşür.

Aerobik Solunum

Aeroplar (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. ve küfler) ve birçok fakültatif anaeroplar (mayalar, *Enterobacteriaceae, Staphylococcus* spp.), aerobik koşullar altında karbohidrat metabolizması sırasında moleküler oksijeni son elektron akseptörü olarak kullanır. Pirüvat ve diğer karboksilik asitler, oksidatif dekarboksilasyon ile tamamıyla okside olur ve CO_2, H_2O ve fazla miktarda ATP üretilir. TCA döngüsü aynı zamanda hücresel yapılarının sentezi için kullanılan çok sayıda ara ürünlerin sentezini de gerçekleştirir. Başlangıçta pirüvat, asetil KoA'ya ve CO_2'e dekarboksile olur. Asetil KoA, okzalasetat ile birleşerek sitratı oluşturur. Birbirini takip eden tepkimeler sonucunda sitrat, 5C'lu ve 4C'lu bileşiklere metabolize olur. 4C'lu süksinat, birkaç tepkime sonrası döngünün başlaması için oksalasetat'a dönüşür. Bu tepkimeler süresince üretilen indirgenmiş bileşikler, sırasıyla elektron taşıma sistemine girer ve $2H^{+}$ ile $2e^{-}$ açığa çıkar. Sitokrom oksidazlar, 2 çift elektronu moleküler oksijen üzerine taşır ve son ürün H_2O oluşur. Eğer bir çift elektron taşınırsa oluşan ürün H_2O_2'tir. Hidrojen peroksit, mikrobiyel katalaz veya peroksidaz tarafından H_2O ve O_2'e hidrolize edilir.

Özetle, kemoorganotroflarda aerobik metabolizma, 3 aşamadan oluşur. Birinci aşamada büyük moleküller olan polisakkarit, protein ve lipitler hidrolize olur veya diğer bir deyişle yapısal bileşenlerine ayrılır. Bu aşamada fazla enerji oluşmaz. İkinci aşamada, birinci aşamada oluşan ürünler monosakkaritler, aminoasitler, yağ asitleri ve gliserol gibi basit moleküllere ayrılır. İkinci aşama, aerobik veya anaerobik olarak gerçekleşebilir ve kilit ürün olarak pirüvat oluşur. Üçüncü aşamada genellikle pirüvat, asetil KoA ile TCA döngüsüne girer ve TCA ara ürünleri oluşur. Bu aşamada ATP, NADH ve $FADH_2$ (Flavin adenin dinükleotit) oluşur. Böylece katabolizmanın üçüncü aşaması boyunca karbonlar TCA'i besler. 1 GTP (Guanozin trifosfat), 4 NADH ve 1 $FADH_2$ üretimi ile 3 CO_2'e okside olur. TCA döngüsü, aerobik olarak oluşur ve fazla miktarda enerji üretiminden sorumludur. Fazla miktarda ATP, elektron taşıma zinciri ile NADH ve $FADH_2$'nin oksidasyonundan açığa çıkar. Her bir pirüvattan 15 ATP ve 3 CO_2 üretilir. İki döngü sonucunda toplam 30 ATP üretilir.

Aerobik solunumda ATP üretim bilançosu Çizelge 01.01'de özetlenmiştir.

Çizelge 01.01 Aerop mikroorganizmaların glikoliz ile enerji kazanımı

Glikolitik yol	Enerji
Substrat fosforilasyonu ATP	2 ATP
Oksidatif fosforilasyon 2 NADH	6 ATP
2 Prüvat 2-Asetil-KoA ile	
Oksidatif fosforilasyon 2 NADH	6 ATP
TCA döngüsü	
Substrat fosforilasyonu GTP	2 ATP
Oksidatif fosforilasyon 6 NADH	18 ATP
Oksidatif fosforilasyon $2FADH_2$	4 ATP
Toplam aerobik üretim	38 ATP

Anaerobik solunum

Aerop olan mikroorganizmalarda, enzim sistemleri son elektron akseptörü olarak oksijeni kullanmaya uygun şekilde yapılanmıştır. Son elektron akseptörü olarak oksijeni kullanamayan mikroorganizmalar, anaerop solunum yaparlar. Fakültatif anaerop mikroorganizmalarda son elektron akseptörü ya serbest oksijen ya da indirgenebilen inorganik bileşiklerdir. En yaygın kullanılan inorganik elektron akseptörü nitrattır. Nitratı indirgeyen bakteriler (*Enterobacteriaceae* türleri, bazı *Bacillus* spp. ve *Staphylococcus* spp.), nitrat redüktaz enzimi içerirler. Metabolize edilebilir karbohidratları EMP, PP ve ED yolu ile kullanırlar. Bu yollar aracılığıyla oluşan pirüvat, etkin bir elektron donörü olarak faaliyet gösterir ve türlere bağlı olarak laktat, asetat, etanol, format, CO_2, H_2, bütandiol, asetoin ve süksinat oluşturur. Sülfat indirgeyen bakteriler (örneğin, *Desulfotomaculum nigrificans*), enerji kaynağı olarak glikozu öncelikle EMP yolu ile metabolize eder ve pirüvat oluşturur. Daha sonra asetat (veya etanol) ve CO_2 oluşturmak için dekarboksile olur. Sülfat, elektron akseptörü olarak görev yapar ve son ürün olarak H_2S oluşur.

Fermantasyon

Fermantasyon, obligat (zorunlu) anaerop bakteriler için başlıca enerji kaynağıdır. Oksijenin varlığında veya yokluğunda gelişebilen fakültatif anaeroplar ise oksijen yokluğunda enerji kaynağı olarak fermantasyonu kullanırlar. Fermantasyonda enerji üretimi çok düşüktür ve sadece substrat fosforilasyonu aşamasında üretilir. Fermantasyonda genellikle NAD ve NADP, elektron taşıyıcı olarak görev yapar. FAD ve sitokrom sistemi, son elektron akseptörü oksijen olmadığı için gerekli değildir.

Monosakkaritler, anaerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmalar tarafından fermente edilir. Aerobik ve anaerobik solunum yokluğunda harici elektron akseptörünün olmaması nedeniyle NADH, elektron taşıma zinciri tarafından okside edilemez. Gliseraldehit-3-fosfat'ın, 1,3-bifosfogliserat'a oksidasyonu süresince, yani glikolitik yol ile üretilen NADH, NAD'a geri okside olmak zorundadır. Eğer NAD rejenere olamazsa (yeniden kazanılamazsa), gliseraldehit-3-fosfat'ın oksidasyonu sona erecek ve glikoliz duracaktır.

Birçok mikroorganizma, bu sorunu pirüvat dehidrogenaz aktivitesini yavaşlatarak veya durdurarak ve fermantasyonda NADH'ın tekrar oksidasyonu için elektron akseptörü olarak pirüvat veya türevlerini kullanarak çözmektedir.

Glikolizde oksijen varlığında veya yokluğunda aynı tepkimeler oluşur. Öncelikli oluşan ürünler pirüvat, NADH ve ATP'dir. Aerobik ve anaerobik solunum arasındaki temel farklılık, pirüvat ve NADH ile ortaya çıkar. Fermantasyon tepkimelerinde pirüvat, çeşitli organik bileşiklere dönüşür ve bu tepkimeler sırasında elektron ve hidrojenler NADH'dan organik bileşiklere aktarılır.

Mikrobiyel fermantasyonda aşağıdaki 2 konu önemlidir:

-NADH, NAD'e okside olur.

-Elektron akseptörü ya pirüvat ya da pirüvat türevleridir; eksojen (dışarıdan gelen, harici) elektron akseptörü yoktur.

Fermantasyonda substrat kısmen okside olur. ATP, substrat fosforilasyonu ile kazanılır ve oksijene ihtiyaç yoktur.

Bozulma

Birçok aerobik ve fakültatif anaerobik bakteri, aerobik koşullarda aminoasitleri okside eder. Bunlar, aminoasitleri karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanır. L-aminoasitler genellikle ya oksidatif deaminasyona ya da transaminasyona uğrar ve keto asitler oluşur. Bu ürünler daha sonra farklı yollar ile kullanılır.

Çürüme

L-aminoasitlerin aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler tarafından parçalanması ya tek ya da iki aminoasit zincirine parçalanması ile gerçekleşir. Tek aminoasidin metabolizmada kullanılması, deaminasyon (C-iskeleti ve NH_3), dekarboksilasyon (C-iskeleti, CO_2, NH_3 ve H_2) veya hidroliz ile gerçekleşir. Daha sonra, C-iskeletleri (yağ asitleri, α-keto asitler ve doymamış asitler), diğer metabolik ürünlerin ve enerjinin kazanımında kullanılır.

Aminoasitlerin mikrobiyel parçalanması sonucunda oluşan ürünler, mikroorganizmaya, aminoasit tipine ve redoks potansiyeline göre çeşitlilik gösterir. Bu ürünlerin bazılarını keto asitler, yağ asitleri, H_2, CO_2, NH_3, H_2S ve aminler oluşturur. Bazı aminoasitlerden oluşan metabolik ürünler, gıdaların bozulmasına yol açması ve sağlığa zararlı olması nedeniyle özel öneme sahiptir. Bu ürünler arasında triptofandan oluşan indol ve skatol, lisinden oluşan kadaverin, ornitinden oluşan putresin, histidinden oluşan histamin, tirozinden oluşan tiramin ile sistein ve metiyoninden oluşan sülfür içeren (H_2S, merkaptan, sülfitler) bileşikler yer almaktadır. Sülfür içeren bu bileşiklerden bazıları, starter kültürlerin proteinaz ve peptidazlarının proteolitik ürünleri olmasının yanı sıra peynirlerde tekstür ve aroma oluşumu açısından hem istenilen hem de istenilmeyen ürünlerdir. *Lactobacillus acidophilus* tarafından treonin aminoasidinden asetaldehit oluşumu, asidofiluslu yoğurda istenilen aromayı kazandırır.

Aminoasit metabolizma profili, bilinmeyen izolatların tanımlanmasında da kullanılır. Triptofandan indol oluşumu *E. coli* ile diğer koliformların ayrımını sağlar. Proteinli bileşiklerin parçalanmasının yanı sıra, gıdalarda gelişme sırasında gıda kaynaklı patojenler tarafından bazı proteinli bileşiklerin sentezi, toksin özelliğinde olmaları nedeniyle önemlidir. Bu protein yapısındaki toksinler arasında, *Staphylococcus aureus* tarafından oluşturulan termostabil (ısıya dayanıklı) toksin, *Clostridium botulinum* tarafından oluşturulan termolabil (ısıya duyarlı) toksin, Shiga toksin gibi gıda kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkili bakteriler tarafından üretilen toksinler yer almaktadır. Esansiyel aminoasitleri (örneğin, lisin), antibakteriyel peptitleri (örneğin, nisin ve pediyosin) ve enzimleri (örneğin, amilaz ve proteinazlar) büyük miktarda sentezleyebilme yeteneğinde olan bazı mikrobiyel türler gıdalarda farklı amaçlar için kullanılmaktadır.

01.05. Sporlanma ve Germinasyon

Sporlanma hem korunma hem de çoğalma şeklidir. Bakteri hücresi her koşulda 1 spor oluşturduğu için bakterilerde sporlanma sadece olumsuz koşullara karşı bir korunma yöntemidir.

Maya ve küflerde ise sporlanma asıl olarak çoğalma yöntemidir, bir hücrede birden fazla spor oluşur. Ancak küflerde 02.02.03. Küf Gelişmesi bölümünde de belirtildiği gibi bazen bir hücre sadece 1 spor oluşturur ve bu durum sadece korunma amaçlıdır.

Bakteri, maya ve küf sporları, her koşulda vejetatif hücreye kıyasla yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, kimyasallar, ışınlama vb. olumsuz çevre koşullarına daha dirençlidir. Yetersiz besin maddesi varlığı, sporlar için sorun değildir çünkü hiçbir metabolik etkinlik göstermezler.

Sporlar, uygun ortam bulduklarında ya da koşullar normale döndüğünde çimlenerek normal vejetatif hücre haline gelir ve yaşamları standart şekilde devam eder.

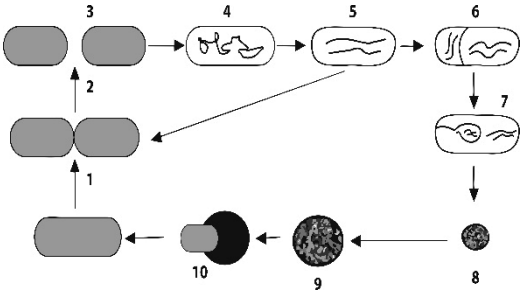
Bu bölümde sadece bakterilerde sporlanma ve germinasyon üzerinde kısa bilgi verilecektir.

Maya ve küflere kıyasla bakterilerde spor oluşturabilen cins sayısı çok azdır. Bununla birlikte, maya ve küfler arasında da spor oluşturmayan türler vardır. Gram pozitif bakterilerden *Bacillus, Alicyclobacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* ve *Sporosarcina* ile Gram negatif *Desulfotomaculum* türleri spor oluşturabilir. Bunlardan *Sporosarcina* dışındakilerin tümü çubuk şeklindedir.

Bakteriler, yaşamlarını tehdit eden çevresel bir sorun ile karşılaştıklarında spor oluştururlar. Spor oluşum süresi; türe, besin maddelerinde azalmaya, olumsuz kimyasal madde varlığına ve yaşamı tehdit edecek boyutta düşük ya da yüksek sıcaklığa bağlıdır ve karmaşık bir değişim sürecidir. Spor oluşumunun başlangıcında hücre protein içeriği giderek artar ve depo maddeleri tümüyle

tüketilir. Sonra hücredeki proteinlerin büyük kısmı parçalanır ve spor protoplastına özgü ve sporda yoğunlaşacak olan dipikolonik asit sentezlenir. Buna paralel olarak Ca^{+2} iyonları derişimi de artar ve Ca-dipikolonat oluşur.

Sporlanma ve çimlenme şekil 01.04'te gösterilmiştir. Buna göre; vejetatif hücre standart şekilde bölünmeye devam eder (1-3). Sporlanma başlamadan hemen önce vejetatif hücredeki genetik materyal, bir eksen üzerinde flament formunu alır ve hücre bölünmesinde olduğu gibi protoplazma membranı içeriye doğru karşılıklı girinti yapar ve septum oluşur (4-5).



Şekil 01.04. Bakterilerde sporlanma ve çimlenme döngüsü

Bu aşamaya kadar olan reaksiyon geri dönebilir, yani hücre, standart bölünme işlemine devam edebilir. Hücre DNA'sının bir kısmı bu yeni oluşum (ön spor) içinde kalır (6). Oluşan sporun membranı gelişmeye devam ederken hücre protoplazması, ön sporu sararak içine alır ve ikinci membranı oluşturur (7). Devamında bakteri, kendi litik enzimleriyle parçalanır ve spor dışarı çıkar (8). Protoplastında yoğun protein içeren, ışığı kuvvetle kıran, spor kuru ağırlığının çok azı su olan (~%15), yüksek sıcaklıklara dayanıklı olgun sporlar, çevreye yayılarak uzun süre (yıllarca) dormant (uyku) halde canlılıklarını sürdürürler. Uyku halinin 300 yıl kadar sürebildiği gösterilmiş olmakla beraber, milyonlarca yıl sürebileceği hakkında görüşler de vardır. Spor, uygun bir ortam bulduğunda çimlenerek vejetatif forma dönüşür (9-10).

Çimlenme, bakterilere göre farklı şekillerde gerçekleşir. Eğer bakteride bir hasar varken sporlanma gerçekleştiyse ya da sporun kendisinde hasar varsa çimlenme işlemi daha uzun sürer. Bu gibi sporlar, "süperdormant" olarak tanımlanır ve standart mikrobiyolojik analizlerle belirlenemedikleri için ileride sorun yaratabilir. Bu özellik, çok genel olarak *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinde görülür. Benzer durum vejetatif hücrelerde de görülür. Canlı fakat kültürü yapılamayan bakteriler (Viable but non-culturable; VBNC), stres altında ve önemli ölçüde hasar görmüş (sublethally injured) olup selektif besiyerlerinde gelişip koloni oluşturamaz. Ancak zamanla hasarlarını onarıp standart vejetatif yaşama devam edebilirler.

Çimlenme öncesi sporlar aktive edilerek makromoleküllerin oluşması sağlanabilir. Bu aktivasyon ılımlı ısıl işlem uygulaması, ılımlı radyasyon uygulaması vb. şekillerde yapılabilir. Ancak bu aktivasyon işlemleri sonunda eğer çevresel koşullar uygun değilse çimlenme gerçekleşmeyebilir.

Sporun çimlenmesi de spor oluşumu gibi karmaşık bir işlemdir. Önce filizlenme olarak tanımlanan bir aşamada spor, su ve besin maddelerini alarak şişer. RNA'yı, proteinleri, membran bileşenlerini ve hücre duvarını onarır/ sentezler. Spor uzar ve DNA replikasyonu (kopyalanması) başlar. Uygun besin maddeleri, pH ve sıcaklık filizlenmeye etkili olan faktörlerdir.

Sporların gıda mikrobiyolojisi açısından önemi, toz ile her tarafa yayılarak gıdaları bulaştırmaları ve başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizma indirgeme yöntemlerine, vejetatif hücrelere kıyasla daha dirençli olmalarıdır. *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens* ve *B. cereus*, gıda kaynaklı hastalıklara yol açarken *Desulfotomaculum* türleri, saprofit olarak gıdalarda bozulmalara neden olurlar.

Yine gıda mikrobiyolojisi açısından sporların uyku halinde tutulması ve çimlenmelerinin önlenmesi üzerine pek çok çalışma yapılmaktadır. Çimlenmenin önüne geçilmesi, öncelikle gıda çeşidine bağlı olup işlenmiş et ürünlerinde nitrit kullanılması, düşük pH, düşük su aktivitesi, soğutma ve NaCl kullanılması, en yaygın uygulamalardır.

Tane Karabiberde Sporlu Bakteri

Tane karabiber gibi ürünlerde bakteriler doğal olarak spor formundadır. Tane karabiberin öğütülerek toz karabiber haline getirilmesi işleminden sporlar etkilenmez. Bu kitabın basıldığı tarihte, 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, Ek 1. Gıda Güvenliği Kriterleri uyarınca baharatta izin verilen değer, *Bacillus cereus* için n= 5; c= 2; m= 10^3 KOB/g ve M= 10^4 KOB/g şeklindedir. İzin verilen bu değere standart olarak 10 kGy gıda ışınlama ile erişilebilir.

Gıda ışınlamaya alternatif olarak tane karabiberin peptonlu su ortamında, oda sıcaklığında 1 saat bekletilmesi ile sporların germinasyonunun sağlanması ve ardından 80 ^oC'ta 3-5 dk ısıl işlem uygulaması ile adı geçen gıda güvenliği kriterlerine erişilebilir. Bu uygulama ile karabiber uçucu yağında kayda değer bir kayıp olmamaktadır ve bu açıdan da Türk Gıda Kodeksi kriterlerine uyum sağlanmaktadır.

Bu işlemde esas olan uygulama, ısıl işlem öncesi sporların germinasyonunun yeterince sağlanması ve devamında uygulanacak ılımlı ısıl işlem ile Türk Gıda Kodeksi'ne uyumun sağlanmasıdır.

Raf Ömrü Uzatılmış Süt

Benzer uygulama, raf ömrü uzatılmış süt (extended shelf life milk) için de geçerlidir. Isıl işlem öncesi 30 dk kadar oda sıcaklığında bekletme ile sporların germinasyonu sağlanır, ardından gelen ısıl işlem daha fazla etkili olur. Burada dikkat edilmesi gereken konu, sporların germinasyonu için beklenirken asitliğin gelişmesi ve duyusal niteliklerin kaybıdır. Isıl işlem öncesi uzun süre beklenirse asitlik gelişir.

Skim Milk Besiyeri Hazırlanması

Laboratuvar ortamında yağsız süt tozundan genellikle %10 derişimde hazırlanan skim milk besiyeri için otoklavlama normu 110 °C'ta 15 dk ya da 115 °C'ta 10 dk şeklindedir. Bu norm, bazen sporlu bakteriler için yeterli olmamakta ve denemeler aksamaktadır. Çözüm, süttozu eritildikten sonra hemen otoklavlama değil 1 saat süre ile oda sıcaklığında bekletildikten sonra otoklavlamaktır. Bu besiyerinin önce 80-85 °C'ta 5-10 dk tutulması, ardından hızla oda sıcaklığına soğutulup 2-3 saat bekletildikten sonra otoklavlanması da geçerlidir. 80-85 °C'ta 5-10 dk tutup hızla soğutmak, sporların germinasyonunu teşvik eder. Nasıl hazırlanırsa hazırlansın, denemeye başlamadan önce hazırlanmış skim milk besiyerinin inkübatörde 37 °C'ta 48-72 saat tutularak steril olduğunun kontrolü önerilir.

02. MİKROORGANİZMA GELİŞMESİ

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK, Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN, Dr. Simel BAĞDER ELMACI

02.01. Genel Bilgiler **023**
02.02. Gelişme Modelleri **024**
02.02.01. Bakteri Gelişmesi 024
02.02.02. Maya Gelişmesi 025
02.02.03. Küf Gelişmesi 026
02.02.04. Virüs (Faj) Gelişmesi 027
02.03. Mikrobiyel Gelişmenin Kimyasal Tanımı **028**
02.04. Gelişme Eğrisi (Kurvesi) **029**
02.05. Gelişme Kinetiği **032**
02.05.01. Gelişme Hızının Substrat Derişimi ile İlişkisi 035
02.05.02. Hücre ve Ürün Oluşumuna İlişkin Verim Katsayıları 037
02.05.03. Substrat Kullanımı ve Ürün Oluşumunun Kinetiği 038
02.05.04. Kesikli Fermantasyonda Verimlilik 042
02.06. Gelişmeye Etki Eden Faktörler **043**
02.06.01. Beslenme 044
02.06.02. Su Aktivitesi 046
02.06.03. Sıcaklık 049
02.06.04. pH 053
02.06.05. Gaz Atmosferi (Oksidasyon-Redüksiyon (O/R) Potansiyeli) 055
02.06.06. İnhibitörlerin Etkisi 057
02.06.07. Kompleks Ortamlarda Mikroorganizma Gelişmesi 058

02.01. Genel Bilgiler

Her canlıda olduğu gibi mikroorganizmalar da nesillerini devam ettirmek için çoğalırlar. Bunun için temel gereksinim beslenmedir. Gelişme için yeterli besin maddesi yoksa çoğalamazlar. Bu durumda ya sadece kendi hayatlarını devam ettirebilir ya da ölürler. Gelişme için sadece besin maddeleri yeterli değildir. Ayrıca sıcaklık, nem (su), ortam asitliği, oksijen vb. koşulların da uygun olması gerekir.

Mikroorganizmalarda gelişme denilince büyümeyle, hücre bölünmesine veya tomurcuklanmasına bağlı olarak hücre sayısının artmasıyla ortaya çıkan ve geri dönüşümü olmayan canlı madde artışı anlaşılmaktadır. Çok hücreli canlılarda kütlesel büyüklük artarken tek hücrelilerde hücre sayısı da artış gösterir. Doğal olarak tek hücrelilerde de hücrenin hacim olarak büyüme göstermesi gelişmenin kapsamı içerisindedir. Bu nedenle mikroorganizmaların gelişmelerinde bu farklılıkları belirtebilmek için mikroorganizma derişimi, bölünme veya

tomurcuklanma değeri, büyüme değeri, generasyon süresi ve ikilenme süresi gibi farklı tanımlamalar kullanılmaktadır.

Mikroorganizma sayısı (adet/mL) veya bununla ilgili diğer tanımları oluşturan hücre sayısı, değişik sayım yöntemleri ile belirlenebilir. Mikroorganizma yoğunluğu (g/L) ve buna bağlı tanımlamalarda ise doğrudan veya dolaylı olarak yoğunluk saptamaya yönelik yöntemlerden yararlanılır.

Bakterilerin gelişmesi genellikle hücre kütlesi veya hücre sayısının iki katına ulaşması için gerekli zamanla karakterize edilir. Kütlenin ikilenme süresi, hücre sayısının ikilenme süresinden farklı olabilir. Çünkü hücre kütlesi, hücre sayısında bir artış olmaksızın artabilir. Buna karşın, eğer belirli bir çevre koşulunda hücre kütlesi ve sayısının ikilenmesi arasında bir benzerlik söz konusu ise organizma üs cinsinden (eksponensiyel hızda) çoğalıyordur.

Prensip olarak kesikli (süreksiz) kültürleme, kapalı bir sistem olarak düşünülebilir. Burada süreç içinde besin girişi yoktur, ancak bazı kültürlemelerde CO_2 gibi olası bir gaz çıkışı ya da asit, alkol vb. metabolit birikmesi olabilir. Mikroorganizmaların çoğalmaları ve ürün oluşturmaları, ortamdaki gerekli besin maddeleri tükeninceye kadar sürer. Ancak oluşan ürünler ve yan ürünler de gelişme üzerine etki eden etmenler arasındadır. Örneğin bu ürünler ortamda fazlaca biriktiklerinde mikroorganizmalar üzerine baskılama (inhibisyon) etkisi gösteriyorlarsa gelişme bir süre sonra yavaşlayacak ve daha sonra da duracaktır.

02.02. Gelişme Modelleri

Mikrobiyel gelişmenin üç genel modeli vardır ve bakteri, maya ve küf gelişmesi olarak örneklenebilir. Bunlar için tipik gelişme hızı değerleri ve generasyon süreleri Çizelge 02.01'de verilmektedir. Virüsler farklıdır ve bu grupta yer almazlar.

Çizelge 02.01. Bazı mikroorganizmaların gelişme hızlarına ilişkin tipik değerler

	μ_{max} (h^{-1})	Generasyon süresi (h)
Maya	0,34 - 0,60	2,00 - 1,15
Bakteri	0,69 - 3,00	1,00 - 0,25 (15′)
Küf	0,10 - 0,30	6,90 - 2,00

02.02.01. Bakteri Gelişmesi

Bakterilerde çoğalma ortadan ikiye bölünme şeklinde olur. Bu bölünme çubuk şeklindeki bakterilerde uzun eksene dikey yönde, koklarda ise herhangi bir çap yönünde meydana gelmektedir. Çubuk şeklindeki bakteriler, çoğalacakları zaman önce ortasından içeriye doğru bir girinti oluşur sonra ikiye bölünürler. Bu iki yeni hücre ayrılabilecekleri gibi ayrılmadan da kalıp çoğalmaya devam edebilir (streptobasil). Koklar, önce biraz büyür ve sonra herhangi bir çap yönünden ikiye bölünür. Bu yeni hücreler birbirinden ayrılabileceği (monokok) gibi ayrılmadan

da kalıp çoğalmaya devam edebilir. 2 adet hücre yapışık şekilde kalabilir (diplokok), aynı eksende çoğalmaya devam edebilir (streptokok), farklı eksenlerde çoğalabilir (stafilokok) ya da birbirine dik 2 eksende çoğalabilir (sarsina). Dişi ve erkek hücrenin olmadığı bu tip çoğalma şekline aseksüel (eşeysiz) üreme/ çoğalma adı verilmektedir. Bazı *E. coli* mutantlarında erkek ve dişi hücrelerin bulunduğu ve konjugasyon sonucunda erkek hücre görevi üstlenen hücreye ait genetik materyalin dişi görevi üstlenen hücreye geçtiği de saptanmıştır.

Çoğalma süresinde hücre kütlesi ve bileşenleri iki katına çıkar ve ana hücre tipik iki kardeş hücreye bölünür. Bakteri popülasyonunda her bir bölünmeye "generasyon", bölünme için geçen süreye de "generasyon süresi" adı verilmektedir. Böylece bakteriler geometrik tarzda çoğalarak katlı bir bölünme göstermektedirler (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64...). Kardeş hücrelerin her biri tamamen ana hücre gibi gelişir. Sonuç olarak, genellikle bakterinin yaşını tespit etmek olanaksızdır. Yaşlı veya genç hücre tanımı tek tek hücrelerin yaşını değil, kültür kabı içerisinde veya inkübatörde geçen zamanı ifade eder.

Yaş tanımına ilişkin tek önemli ayrıcalık, çevresel değişikliğin spesifik enzimin sentezlenmesini engellemesi durumunda meydana gelir. Enzim, çoğalma boyunca daha fazla sentezlenemez. Hücre bölünmeye devam ettiğinden hücre dışına salgılanan enzim de üs cinsinden seyrelmektedir. Sonuç olarak kültüre özgü yaş, hücre içindeki enzim seviyesi ile belirlenebilir.

İkilenme zamanı bakteri türlerine göre değişiklik gösterir. Bu süre optimum koşullarda *Vibrio parahaemolyticus* için 9 dk iken *Rhizobium* türlerinde 6-7 saate kadar uzamaktadır. Bölünme süresi bakteriler için çok genel olarak 30-60 dk olarak kabul edilebilir.

02.02.02. Maya Gelişmesi

Mayalarda çoğalma tomurcuklanma, bölünme, sporlanma ve cinsel çoğalma ile olmakta ise de mayalar yaygın biçimde tomurcuklanma ile çoğalırlar. Tomurcuklanmada ana hücre üzerinde bir tomurcuk oluşur. *Saccharomyces* cinsi mayalarda sıklıkla görülen bir çoğalma şeklidir. Bu tomurcuk yaklaşık ana hücre kadar olana dek gelişir ve bu noktada oğul hücre ayrılır. Bakteri bölünmesinin tersine ana ve oğul hücreyi fiziksel olarak ayırt etmek mümkündür. Çünkü ana hücre, oluşan her oğul hücre için tomurcuklanmadan kalan bir iz kazanır. Tomurcuklanma aynı anda iki uçta da görülebilir. Böylece gelişen maya popülasyonu sürekli değişen bir yaş dağılımına sahiptir.

Bazı maya türleri, bakterilerde olduğu gibi ikiye bölünerek çoğalır. Maya hücresi belli bir büyüklüğe erişince ortadan ikiye bölünür. Mayalarda diğer bir çoğalma şekli ise sporla çoğalmadır. Sporla çoğalmada önce maya hücresinin çekirdeğinde bölünmeler meydana gelir, sonra bölünen çekirdeklerin etrafındaki protoplazma yoğunlaşarak spora dönüşür. Sporla çoğalmada 1 maya hücresi içinde "askospor" adı verilen 1-8 arasında spor oluşabilir.

Maya sporları da tıpkı bakterilerin yaptığı endosporlar gibi fiziksel ve kimyasal etkilere karşı daha dayanıklıdırlar. Sporlanma bakterilerde sadece bir korunma formu olup her bakteri hücresi sadece 1 spor oluşturur, dolayısı ile sporlanma bakteriler için bir çoğalma şekli değildir. Ancak maya hücresi içinde birden fazla askospor oluştuğu için mayalarda sporlanma hem çoğalma hem de korunma şeklidir. Sporlar uygun bir ortam bulduklarında çimlenerek standart maya hücresi formuna dönüşürler.

Eşeyli çoğalma, "kopülasyon" olarak da anılır. Hücrelerden biri erkek diğeri dişi hücre görevi üstlenir. Mayalarda eşeyli çoğalma farklı şekillerde gerçekleşir.

Bazı gelişme koşullarında tomurcuklar ana hücreden ayrılmaz, uzun ve dallanmış hücre grupları oluşur (pseudomisel).

Optimum koşullarda mayanın ikilenme süresi 45 dk gibi çok kısa olabilir. Fakat 90-120 dk daha tipiktir.

02.02.03. Küf Gelişmesi

Küfler tipik olarak zincir şeklinde uzamak veya dallanmak suretiyle gelişirler. Gelişme, miselin ucundan hücreler arasında bir septa (duvar) oluşmasıyla gerçekleşir. Fizikokimyasal çevreye bağlı olarak misel uzun, dağınık, kısa ve çok dağınık veya bunların bir karışımı şeklinde olabilir. Yüzeyde geliştiği zaman miseller örgü şeklinde ve kalın bir paspas formunda olabilir. Derin kültürde miseller dağılmış veya çapı 0,1-1,0 mm arasında değişen peletler şeklinde olabilir.

Küflerde hücre sayısı yönünden gelişmeyi izlemek çok zordur. Çünkü hücreler birbirinden kolaylıkla ayrılmaz. Bu nedenle gelişmeyi belirlemek için kütledeki artıştan yararlanılır.

Küflerin yaş dağılımı ve morfolojisi, fermantasyon prosesinin kinetiği için çok önemlidir. Bazı proseslerde yalnızca yaşlı hücreler ürün üretirler, fakat bazı proseslerde yalnızca genç hücrelere gerek duyulur.

Küflerde kütlenin iki katına çıkma süresi genellikle 4-6 saattir, fakat bazı küf türlerinde bu sürenin 60-70 dk kadar kısa olduğu belirtilmektedir. *Crysoniella* (syn. *Monillia*) sp., gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında özellikle nemli ortamlarda 1 gece inkübasyon sonrasında Petri kutusu kapağından saçaklar halinde dışarı çıkabilecek kadar hızlı çoğalan kavuniçi renkli bir küftür. Küflerde çoğalma göreceli olarak bakteri ve mayalara göre uzun sürer. Buna dayanarak standart mikrobiyolojik çalışmalarda küf analizi 5 gün sürer.

Küflerde de çoğalma vejetatif (eşeysiz) ve cinsel (eşeyli) olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Yaşam döngüleri içinde eşeyli ve eşeysiz çoğalma evreleri vardır. Bugüne kadar eşeyli çoğalma aşaması saptanamamış olan türler Fungi imperfecti (*Deuteromycetes*) sınıfı içinde toplanır.

Eşeysiz çoğalmanın en basit şekli miselyumların uygun koşullarda çoğalmalarıdır ve koşullar uygun olduğunda çok hızlı gerçekleşir. Ancak vejetatif çoğalma asıl olarak sporlarla olmaktadır. Spor farklı şekillerde oluşturulabilir. Aynı anda binlerce spor oluşturulabileceği gibi klamidospor örneğinde olduğu gibi miseldeki bir hücrenin etrafında kalın bir duvarın oluşumu ile de spor oluşabilmektedir. Duvarı kalınlaşan bu hücre, çeşitli etkenlere karşı vejetatif hücreden daha fazla dayanıklılık gösterir. Bu oluşum çoğalma değil, bakterilerde olduğu gibi her hücreden 1 spor oluştuğu için korunma şeklidir.

Bazı küf türlerinde hif üzerindeki hücreler birbirlerinden bir duvar (septa) ile ayrılmışlardır. Septalı küflerin hifleri, uygun koşullar altında kendini oluşturan hücrelere ayrılarak çeşitli etkenlere karşı daha dayanıklı bir hale gelirler. Bunlara "oidium" veya "arthrospor" adı verilir ve bu hücreler diğer küf hücrelerine göre biraz daha fazla dayanıklılık gösterirler. Oidiumlar da uygun koşullar altında gelişebilmekte ve bu bakımdan da spor veya konidium vazifesi görmektedirler.

Küflerde cinsel çoğalma, cinsel olmayan çoğalmaya göre daha az görülmektedir. Çünkü bu tarz çoğalma için özel koşulların oluşması gerekmektedir. Cinsel çoğalma; askospor ile çoğalma, oospor ile çoğalma ve zigospor ile çoğalma olmak üzere üç farklı şekilde meydana gelir.

02.02.04. Virüs (Faj) Gelişmesi

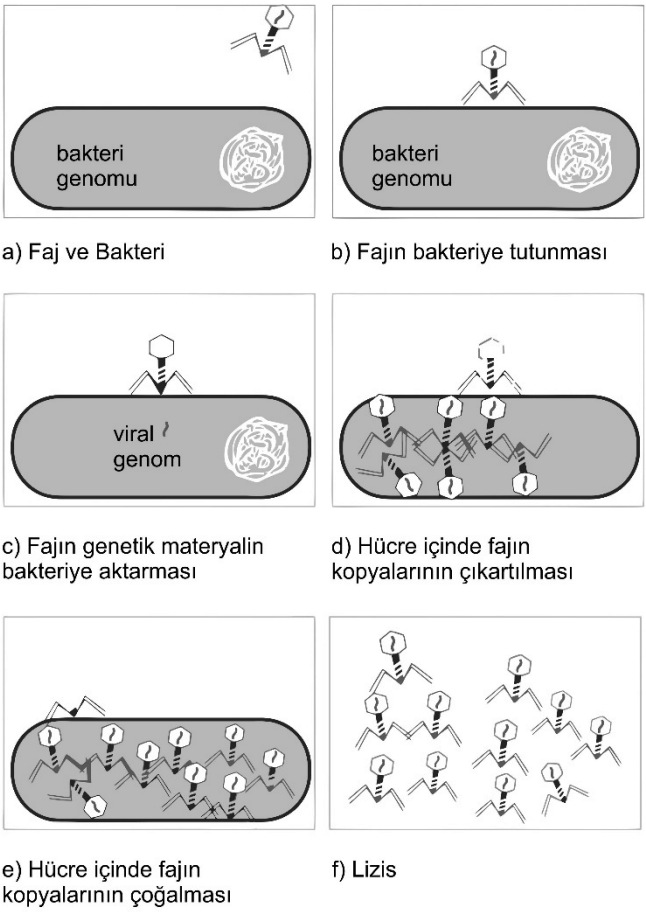
Bakteri virüsleri (bakteriyofajlar ya da kısaca fajlar[1]) mikrobiyolojide özel bir gruptur. Süt endüstrisinde starter kültür kullanımı 1890'lı yıllarda başlamıştır. Zamanla ve özellikle peynir işletmelerinde starter kültürün yeterli asit oluşturamadığı durumlar ile karşılaşılmış ve ekonomik kayıplar olmuştur. Gıda mikrobiyolojisi fajlarla ilk kez 1935 yılında Yeni Zelanda'da bir süt işletmesinde kullanılan starter kültürde Whitehead'in faj varlığını göstermesi ile tanışmıştır. Starter kültüre bulaşan faj, bu kültürü parçalayarak starter kültürün kendisinden beklenen işlevini yitirmesine neden olur. Starter kullanan gıda işletmelerinde faj bulaşması ekonomik kayıplara neden olur. Belirli bir patojenin (örneğin *Listeria monocytogenes*) imhasını sağlayan preparatlar ise giderek yaygın bir şekilde kullanılmaya başlamıştır.

Fajlar, normal gelişme modelleri izleyemezler. Bunlar, konakçı bir organizmaya gerek duyarlar. Konakçılar bir bakteri, maya, küf veya daha yüksek formda bir hücre olabilir. Virüsler yapı olarak basit bir genetik materyalden (DNA ya da RNA) oluşur ve bu genetik materyal genellikle protein bir kılıf içinde toplanmıştır. Tek virüs partikülleri olarak veya konakçı hücre üzerinde birleşmiş halde bulunabilirler. Çoğalmak için bir hücreye tutunmalı, tutunduğu hücrenin proteinini ve nükleik asidini kullanmalıdırlar. Bir hücre içindeki tek bir virüs, hücre patlayıp

[1] Faj kelimesi "yiyen" ve buna göre bakteriyofaj "bakteri yiyen" anlamına gelir. Sadece faj denilince bakteriyofaj anlaşılır. Küfler ile ilgili fajlara mikofaj (mycophage) adı verilir.

açılmadan ve yeni oluşan virüsleri salıvermeden önce 50-300 kez çoğalabilir. Böylece gelişme üs cinsindendir, fakat üs rakam 2'den daha büyüktür.

Şekil 02.01'de bakteriyofajın bakteri hücresi içine girmesi, hücre içinde çoğalması ve ortama salınması gösterilmektedir.



a) Faj ve Bakteri

b) Fajın bakteriye tutunması

c) Fajın genetik materyalin bakteriye aktarması

d) Hücre içinde fajın kopyalarının çıkartılması

e) Hücre içinde fajın kopyalarının çoğalması

f) Lizis

Şekil 02.01. Bakteriyofajın çoğalması

02.03. Mikrobiyel Gelişmenin Kimyasal Tanımı

Çoğalma, hücre kütlesinin sentezi ile ilgili bir seri kimyasal tepkimeler olarak görülebilir. Çoğalma için genelleştirilmiş sitokiyometrik bir formül şöyle yazılabilir:

$$A(C_aH_bO_c) + B(O_2) + D(NH_3) \rightarrow M(C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta) + P(CO_2) + Q(H_2O)$$

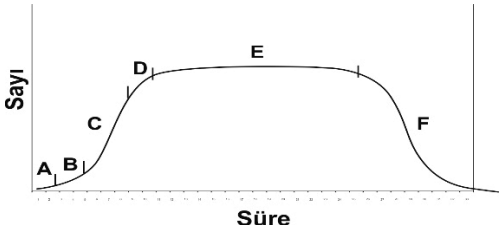
Burada A, B, D, P ve Q ilgili bileşenlerin mol'leridir. $C_aH_bO_c$, karbon ve enerji kaynağı olarak genelleştirilmiştir. M ise bir birim hücrenin mol sayısıdır ($C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$).

Örneğin, tipik bir maya $C_6H_{11}NO_3$ şeklinde gösterilebilir. Böylece hücrenin organik fraksiyonunun bir biriminin molekül ağırlığı 145 olacaktır. Eğer hücre %90 organik fraksiyon ve %10 kül içeriyorsa bir birim hücrenin yaklaşık olarak tüm formül ağırlığı 145/0,9 = 161'dir.

Bu sitokiyometrik ilişkiye dayanarak oluşan her hücre kütlesinin tüketilen her substrat kütlesine oranı (M/A), "hücre verimi" olarak belirtilir. Bu verim, hem hücre kütlesinde birleştirilmiş hem de çoğalmak için enerji sağlamak amacıyla CO_2 veya H_2O'ya parçalanmış olan karbon kaynağının kullanım etkinliğine bağlıdır.

02.04. Gelişme Eğrisi (Kurvesi)

Kimyasal yönden belirli bir ortamda ve belli koşullarda gelişen bir bakterinin kesikli kültürdeki tipik gelişme kurvesi (eğrisi), aşağıda verilmiş olan evreleri içermektedir (Şekil 02.02). Gelişme, genellikle hücre kütlesi esas alınarak belirlenmektedir ve bu metinde aksi belirtilmedikçe bu geçerli olacaktır.



Şekil 02.02. Bir bakterinin kesikli kültürdeki gelişme kurvesi

A. Adaptasyon (uyum sağlama) evresi (lag faz): Belirli bir besi ortamına inoküle edilen bakteri, yeni ortama uyum gösterip çoğalmaya başlayana kadar belirli bir süre geçer. Bakteri kültürü, lag fazını makro ve mikro moleküler bileşimini yeniden düzenlemek ve substrata bağlı olarak enzimlerini sentezlemek için kullanır. Bu sürede hücre sayısında hemen hemen hiçbir artış gözlenmez. Fakat hücre kütlesi artabilir.

Moleküler düzeyde devam eden tepkimeler çok iyi anlaşılamaz, fakat hücrede önemli ölçüde RNA sentezinin gerçekleştiği bilinmektedir. Lag faz süresi bakterinin fizyolojik durumuna ve inoküle edildiği besiyerinin doğasına bağlı olarak değişir. Mikroorganizmanın yaşı, hasarlı olup olmaması, daha önce geliştirildiği ortam ve muhafaza edildiği sıcaklık, lag faz süresine etki eden faktörlerdir.

Lag faz aşamasında bakteri bir anlamda çoğalma için kendini hazırlar ve gerekli enzimlerini sentezler. Bakteri bu ortama aşılanmadan önce aktif durumda ise ve besiyeri basit bileşenlerden oluşuyorsa lag süresi kısa olur. Tersine, örneğin

glikozlu bir ortamda geliştirilen laktoz$^+$ bakteri, laktozlu bir ortama aktarılırsa bakterinin gerekli enzimleri sentezlemesi için daha uzun bir süre gerekir.

Mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen endüstriyel üretimlerde bu sürenin kısaltılması ekonomik yönden büyük yararlar sağlar. Bu süreyi kısaltmak için;

-İnokülasyon oranı yüksek tutulmalı (örneğin, mayalarda %5),

-İnokülasyonda yüksek oranda canlı hücreler kullanılmalı,

-Ortamda çözünmeyen substratlar bulunmamalı (örneğin şekerlerle fosfatlar birlikte sterilize edilirlerse bu maddeler suda çözünmeyen ve mikroorganizmaların yararlanamayacağı bir form oluştururlar),

-Ortamda toksik maddeler bulunmamalıdır.

Matematiksel olarak, lag faz süresi yalnızca inokülüm miktarına (X_o) bağlı olup substrat derişimine (S_o) bağlı değildir. Fakat bu süreye yalnızca inoküle edilen hücre sayısı değil, hücrelerin yaş ve fizyolojik durumları da etkilidir. Dolayısıyla, logaritmik çoğalma evresindeki hücrelerin kullanıldığı inokülant, en uygun önkültürü oluşturacaktır.

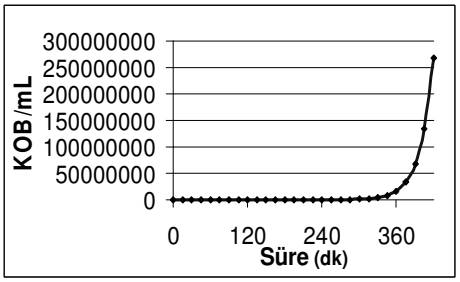
Lag faz süresinin kısa ya da uzun olması, analiz edilen numunedeki mikroorganizma sayısı hakkında bilgi verebilir. Empedans/ kondüktans yöntemi ile yapılan mikroorganizma sayımları, bu sürenin kısa ya da uzun olması esasına dayanır (bknz $\Rightarrow$ 08.04.01. Empedans/ Kondüktans Ölçümü).

B. Hızlanma evresi: Lag faz ile logaritmik faz arasında yer alan bu evre, genellikle kısa bir süreyi kapsar. Matematik ve biyolojik olarak iyi açıklanamaz. Oğul hücrelerin oranı toplam popülasyonun yarısına ulaşma çabasındadır.

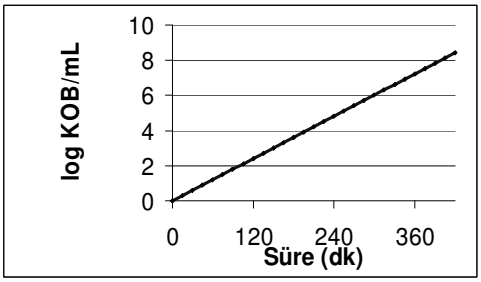
C. Logaritmik (üs cinsinden) çoğalma (gelişme) evresi: Bu evrede mikroorganizmanın canlı, genç ve dinç olduğu kabul edilir. Hücreler en yüksek hızla bölünme yeteneğindedir. Ortamda besin fazla olup gelişmeyi engelleyici maddeler yoktur.

Bu durumda özgül gelişme hızı maksimumdur (μ= sabit= μ_{max}). Mikroorganizmaların ölümü yok sayılabileceğinden kinetik hesaplamalarda bu etmen göz önüne alınmaz. Bu evrede hücre sayısındaki artışın hücre kütlesindeki artış ile benzer olduğu gözlenir.

Logaritmik gelişme evresinde zamana bağlı olarak sayı artışı, standart şekilde KOB/mL olarak grafiğe aktarılacak olursa (a) sağlıklı bir grafik elde edilemez (Şekil 02.03). Aynı sayıların logaritması alınarak log KOB/mL olarak grafiği çizilirse (b) anlamlı bir grafik elde edilir. Bu evrede de sayı artışı geometrik olup ikiye katlanma şeklindedir. Logaritmik bir artış yoktur. Sayıların logaritmaları alınarak grafiğe işlendiğinde düz bir hat elde edildiği için bu isimle anılır.



a) KOB/mL



b) log KOB/mL

Şekil 02.03. Logaritmik gelişme evresinin grafiksel ifadesi

D. Yavaşlama evresi: Mikroorganizmalar hızla çoğalarak en yüksek sayıya (genellikle 10^8-10^9 hücre/mL) ulaşmış olmaları nedeniyle kültür ortamında besinler giderek azalmaktadır. Aynı zamanda ortamda toksik etken olabilecek metabolik ürünler birikmektedir. Sonuç olarak, çevre koşulları mikroorganizma aleyhine değişmektedir. Hücre popülasyonu hâlâ artmaktadır (çoğalma hızı> ölüm hızı), fakat özgül gelişme hızı giderek düşmekte ($\mu < \mu_{max}$), bir diğer deyişle gelişme gerçekten yavaşlamaktadır. Bu evrede hücrelerin biyokimyasal ve morfolojik yapıları farklılaşmaktadır. Yeni oğul hücrelerin oluşumu azalır ve durur.

E. Durma evresi (sabit evre): Besin maddelerinin çoğu kullanıldıktan sonra gittikçe kısıtlanan koşullar nedeniyle gelişme daha fazla süremez. Hücreler bölünmeyi durdurur ve canlı hücreler ölü hücrelerle dengeye ulaşırlar (gelişme hızı= ölüm hızı). Mikroorganizmanın durma evresi, gelişme eğrisinde oldukça düz seyreden yatay bir çizgi şeklindedir. Net gelişme hızı durmuş olsa da ortamda ya da hücrede metabolizma faaliyetleri sürmektedir.

F. Azalma ve ölüm evresi: Mikroorganizmaların ölüm hızları arttığı için zamanla canlı hücre sayısında bir azalma görülür. Otoliz ürünleri ortamda birikmektedir. Özgül gelişme hızı negatif olup ($\mu < 0$) tüm hücreler öldükten sonra sıfır olur. Çok uzun süre inkübasyonda kalmış kültürlerden bu nedenle canlı hücre alınamaz ve bu durum "otosterilizasyon" olarak tanımlanır.

Mikroorganizmaların gelişmeleri sırasındaki evrelere göre enzimlerin oluşumları da farklı olur. Örneğin, *Bacillus subtilis* gibi bazı bakterilerde proteinazların oluşumu hemen hemen yalnız logaritmik evrede, amilazların oluşumu ise sabit evrede görülür. Hücrelerarası (intracellular) enzimler, genellikle logaritmik evrede oluştuğu halde bunların ortama salgılanması azalma evresinde olur. Bu evrede hidrolitik ve lipolitik enzimlerin hücre zarlarında meydana getirdiği parçalanma olayı olan "lizis" gözlenir.

02.05. Gelişme Kinetiği

Gelişme kinetiği, mikroorganizmanın çoğalmasını ve ürün oluşturmasını matematiksel bağıntılarla tanımlar. Bu, yalnızca aktif hücre gelişmesini değil, aynı zamanda dinlenen veya gelişmesini durduran hücrelerin aktivitelerini de içermektedir. Çünkü ticari önemi olan birçok fermantasyon ürünü, hücre gelişmesi tamamlandıktan sonra meydana gelir. Bazı endüstriyel üretimlerde ise hücre öldükten sonra ortaya salınan enzimler, gerekli biyodönüşümleri gerçekleştirerek ürün oluşumunu sağlarlar.

Tüm gelişme parametrelerinin (fiziksel, kimyasal, biyolojik) optimize edilmesinden (en uygun hale getirilmesinden) sonra limitsiz (sınırsız) bir gelişme düşünülebilir. Koşulları en uygun hale getirebilmek yani sınırlanmamış bir gelişmenin olması için;

-Gereksinim duyulan besinlerin, ortamda talep edilenlerden fazla bulunması,

-Ortamda çözünmeyen elementlerin bulunmaması,

-Hücrelerin aktif olması,

-Ortamda gelişmeyi engelleyici inhibitörlerin (baskılayıcıların) bulunmaması gereklidir. Bu koşulda hücre üs cinsinden (eksponensiyel hızda) çoğalıyordur ve çoğalma şöyle tanımlanır:

$$dx / dt = \mu X \qquad 02.01$$

$$dN / dt = \mu_n N \qquad 02.02$$

Burada;

X: Hücre konsantrasyonu (g/L); N: Hücre konsantrasyonu (adet/mL); t: Zaman (h); μ: Özgül gelişme hızı (h^{-1}) (kütle); μ_n: Özgül gelişme hızı (h^{-1}) (sayı).

-02.01 Eşitlik zamana bağlı olarak hücre kütlesindeki artışı,
-02.02 Eşitlik zamana bağlı olarak hücre sayısındaki artışı gösterir.
Bu eşitliğin integrali alındığında

$$\int_{x1}^{x2} \frac{dx}{dt} = \int_{t1}^{t2} \mu dt \qquad 02.03$$

elde edilir.

Eğer özgül gelişme hızı sabitse

$$ln(X_2 / X_1) = \mu \Delta t \qquad 02.04$$

veya;

$$\mu = (lnX_2 - lnX_1) / \Delta t \qquad 02.05$$

Mikroorganizma sayısı olarak ifade edildiğinde ise

$$M = (lnN_2 - lnN_1) / \Delta t \qquad 02.06$$

eşitliği elde edilir.

$X_2 = 2X_1$ olması durumunda Δt; $(t_2 - t_1) = t_d$, yani ikilenme süresini gösterir ve buradan;

$$td = ln(X_2 / X_1) / \mu \Rightarrow \mu = (ln2 / \mu) = 0{,}693 / \mu \qquad 02.07$$

şeklinde gösterilir.

Problem 02.01: Bir mikroorganizmanın gelişme ortamından belirli aralıklar ile alınan örneklerde ölçülen hücre konsantrasyonu aşağıda verilmiştir. Bu mikroorganizmanın maksimum özgül gelişme hızını hesaplayınız.

Zaman (h)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
X (g/L)	0,950	1,063	1,513	2,010	2,313	2,550	2,750	2,906	3,060	3,068

Çözüm: Öncelikle zamana karşı hücre konsantrasyonunda artışı gösteren gelişme kurvesi çizilir. Bu kurve üzerinde en dik eğim ile belirlenen hücre artışının görüldüğü evre, logaritmik evreyi işaret eder. Bu evreyi kapsayan iki zaman aralığında (örneğin, 6-8. saatler arası) hesaplanacak özgül gelişme hızı ise maksimum özgül gelişme hızını verecektir.

$\mu = [ln(X_2 / X_1) / \Delta t] = [ln(2{,}010 / 1{,}513) / 2] = \ln 1{,}328 / 2 = 0{,}284 / 2 = 0{,}142\ h^{-1}$

$\mu_{max} = 0{,}142\ h^{-1}$

Problem 02.02: Belirli kültür koşullarında özgül gelişme hızı $\mu = 0{,}462\ h^{-1}$ olan mikroorganizmanın ikilenme süresi (t_d) ne kadardır?

Çözüm:

$Td = 0{,}693 / \mu = 0{,}693 / 0{,}462 = 1{,}5\ h = 90$ dakikadır.

Logaritmik evrede mikroorganizmaların çoğalmaları üssel

$$N = N_0\, e^{\mu.t} \qquad 02.08$$

ya da

$$X = X_0\, e^{\mu.t} \qquad 02.09$$

eşitlikleri ile verilmektedir. Burada, N_0 veya X_0 ortamda başlangıçta bulunan hücre konsantrasyonu, N veya X ise herhangi bir t anındaki mikroorganizma konsantrasyonu göstermektedir. Bu eşitliğin "e" tabanına göre logaritması alınarak;

$$lnN = lnN_0 + \mu t \qquad 02.10$$

ya da

$$ln(N / N_0) = \mu t \qquad 02.11$$

şeklinde daha önce verilen 02.04 eşitliğine benzer bir eşitlik elde edilir.

Problem 02.03: Bir ortamda bakteriler sürekli olarak ve her saatte mevcut sayılarının %20'si oranında artıyorlar. Başlangıçtaki hücre sayısı 10^3 KOB/mL ise 6 saat sonra bakteri sayısı ne olur?

Çözüm: $N = N_0 \times e^{\mu.t}$
$= 1000 \times e^{0,20 \times 6}$
$= 1000 \times e^{1,2}$
$= 1000 \times 3,320$
$= 3320$ KOB/mL $= 3,3 \times 10^3$ KOB/mL

Problem 02.04: Bir sıvı kültürde canlı bakteri sayısı $N_0 = 2,5 \times 10^3$ KOB/mL kadardır. Bu bakterinin ikilenme suresi 17 dakika ise 3,5 saat sonra bakteri sayısı kaça ulaşır?

Çözüm: Önce özgül gelişme hızı ($\mu = 0,693/t_d$), sonra N hesaplanır ($N = N_0 \times e^{\mu.t}$). Ancak ikilenme süresi genelde saat (h) olarak verildiğinden t_d'nin de saate çevrilmesi gerekir.
$t_d = 17$ dakika $= 17/60$ h $= 0,28$ h
$\mu = 0,693 / 0,28 = 2,475$ h^{-1}
$N = 2,5 \times 10^3 \times e^{2,47 \times 3,5} = 1,3 \times 10^7$ KOB/mL

Problem 02.05: Oda sıcaklığında ve süt ortamında ikilenme süresi $t_d = 25$ dk olan gıda bozulma etmeni olan bir bakterinin sütteki düzeyi başlangıçta $N_0 = 10^4$ KOB/mL olsun. Bu bakterinin sütte bozulma düzeyini 10^7 KOB/mL kabul edersek bozulma düzeyine ne kadar zamanda ulaşır?

Çözüm: Önce ikilenme süresinden özgül gelişme hızı hesaplanır ($t_d = 25$ dk $= 0,417$ h)

$\mu = 0,693 / 0,417 = 1,66$ h^{-1}

Sonra ilgili eşitlik kullanılarak süre bulunur.

$N = N_0 e^{\mu t} \Rightarrow N / N_0 = e^{\mu t} \Rightarrow \ln(n / N_0) = \mu t \Rightarrow t = [\ln(N / N_0) / \mu] = \ln(10^3) / 1,66 = 4,16$ h

Gelişme kinetiğine farklı bir yaklaşım

Üs cinsinden çoğalma evresinde generasyon süresini, sayısını ve hızını daha basit matematiksel formüllerle saptamak da mümkündür. Bu evrede çoğalma logaritmik bir dizi oluşturarak gerçekleşir. Her bölünmede hücre sayısı iki katına ulaştığı için ilerleyen zaman içinde 2^1; 2^2; 2^3; 2^4; …2^n şeklinde bir dizi oluşur. Üs cinsinden çoğalma evresinin başında N_0 sayıdaki hücre, n kadar bölünmeden sonra $N = N_0 \times 2^n$ sayıya ulaşır. Bu eşitliğin logaritması alındığında;

$$\log N = \log N_0 + (n \times \log 2) \qquad 02.12$$

eşitliği elde edilir.

Basit bir örnekle, üs cinsinden çoğalma evresinde başlangıçta 10 KOB/mL olan hücre sayısı (N_0), 20 generasyon sonra (n);

$\log N = \log 10 + (20 \times 0,301)$

$\log N = 1 + 6,02$

$N = 7,02$ log KOB/ mL hücre sayısına erişir.

02.12 nolu eşitlikten üslü çoğalma evresinde hücre bölünme sayısı (generasyon sayısı, yeni kuşak oluşum sayısı);

$$n= [(\log N - \log N_0) / \log 2] \quad 02.13$$

eşitliği ile belirlenir.

Birim zamandaki hücre bölünme sayısı, bölünme hızı (v) olarak ifade edilir ve belirli bir sürede meydana gelen bölünme sayısının geçen zamana (t) bölünmesi ile hesaplanır.

$$v= n / t = [(\log N - \log N_0) / (\log 2 \times t)] \quad 02.14$$

Bölünme süresi (generasyon süresi ya da ikilenme süresi) (g), popülasyondaki hücre sayısının iki katına çıkması için geçen süreyi tanımlar.

$$g= t / n = 1 / v \quad 02.15$$

Bölünme hızı v= 1 / g olarak da ifade edilebilir.

Problem 02.06. Bir bakteri kültürü ile aşılanan besiyerinde logaritmik çoğalma evresinin başında hücre sayısı 10^4 KOB/mL iken gelişmenin 10. saati sonunda 10^9 KOB/mL sayıya ulaşmışsa;

a) Bu kültürün bölünme sayısı;

$n= [(\log N - \log N_0) / \log 2] = [(\log 10^9 – \log 10^4) / \log 2] = 5 / 0{,}301 = 16{,}6$

b) Bu kültürün bölünme hızı;

$v= (n / t) = [(\log N - \log N_0) / (\log 2 \times t)] = 5 / (0{,}301 \times 10) = 1{,}66\ h^{-1}$

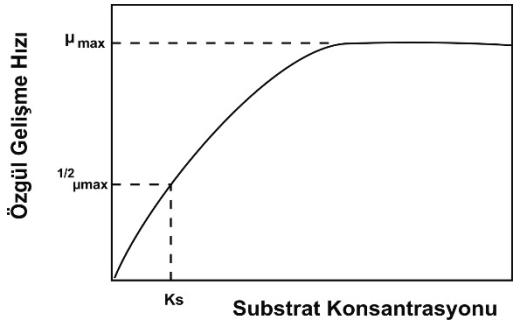
c) Generasyon (ikilenme) süresi

$g= (1 /v) = (1 / 1{,}66) = 0{,}6$ saat (36 dakika)

02.05.01. Gelişme Hızının Substrat Derişimi ile İlişkisi

Besin ortamında bulunan ve gelişmenin niteliği üzerine etki eden belirli besin maddelerine "gelişmeyi sınırlayan (limitleyen) substrat" denilmektedir. Genellikle besi ortamında gelişmeyi sınırlayan birçok türde ve sayıda substrat bulunmaktadır. Ancak mikrobiyel kinetik bağıntıların türetilmesinde bu besinlerden yalnızca en önemli olan biri seçilir, diğerlerinin ortamda yeterince var olduğu kabul edilir ve hesaplamaların hangi substrata göre yapıldığı belirtilir (örneğin S_{glikoz}).

Kesikli kültürlemede mikroorganizma özgül gelişme hızı, substrat derişimindeki değişime bağımlıdır. Gelişme hızı, kimyasal tepkimelerin hızına benzer şekilde ve ortamdaki kimyasal maddelerin derişiminin bir fonksiyonudur. Gelişme hızı ve substrat derişimi arasındaki matematiksel ilişki Monod modeli ile 1949 yılında açıklanmıştır (Şekil 02.04).



Şekil 02.04. Mikrobiyel gelişmeye ilişkin Monod modeli

$$\mu = \mu_{max} [S / (K_s + S)] \qquad 02.16$$

Burada;

μ: Özgül gelişme hızı (h^{-1})

μ_{max}: Maksimum özgül gelişme hızı (h^{-1})

S: Gelişmeyi sınırlayan substratın derişimi (g/L)

K_s: $\mu = ½ \mu_{max}$ olduğunda substrat derişimine eşit olan bir sabit (doymuşluk sabiti)

Çizelge 02.02'den de görüleceği gibi K_s'nin tipik değerleri "mg/L" şeklinde ifade edilebilecek ölçüde çok küçüktür. Böylece genel bir yaklaşımla aşağıdaki varsayımlar yapılabilir.

Çizelge 02.02. Monod gelişme modeline ait bazı K_s değerleri

Substrat	K_s (mg/L)	Organizma
Glikoz	1,0	*Enterobacter aerogenes*
Glikoz	2,0-4,0	*Escherichia coli*
Glikoz	25,0	*Saccharomyces cerevisiae*
Riboz	3,0	*Hansenula polymorpha*
Metanol	120,0	*Hansenula polymorpha*
Amonyak	0,1	*Enterobacter aerogenes*
Magnezyum	0,6	*Enterobacter aerogenes*
Sülfat	3,0	*Enterobacter aerogenes*

S> 10 K_s olduğunda $\mu \cong \mu_{max}$'tır,

S< 10 K_s olduğunda artık μ, μ_{max}'tan küçüktür.

Görüldüğü gibi özgül gelişme hızı, substrat derişiminin kuvvetli bir fonksiyonudur. Logaritmik evre süresince özgül gelişme hızı sabit olup μ_{max}'a eşittir. Çünkü K_s çok küçüktür.

Logaritmik evreden durma evresine geçiş çok hızlı ya da aniden gerçekleşir. Çünkü bu noktada ortamda kalan substrat azdır ve yüksek hücre popülasyonu kalan substratı hızla kullanır. Bu nedenle kesikli kültürlemede K_s değerini hesaplamak çok zordur. Buna rağmen başlangıçta düşük substrat seviyeleri kullanarak ve substrat derişiminde önemli değişmeler olmadan önce başlangıç gelişme hızının hesaplanmasıyla elde edilen başlangıç kinetik değerlerinden yararlanılabilir. Bu işlem, Petri kutusunda kültürel sayım veya diğer duyarlı yöntemlerle yapılabilir. En iyi ve en çok uygulanan yöntem, K_s'yi sürekli kültürde hesaplamaktır.

Monod bağıntısı, substrat inhibisyonunun (baskılamasının) olmadığı ve metabolik ürünlerden etkilenmeyen homojen kültürlerle çalışıldığında geçerlidir. Eğer mikroorganizma gelişimi metabolitlerden etkileniyorsa veya substrat inhibisyonu söz konusu ise bu eşitlik daha karmaşık olacaktır.

Besin derişiminin yüksek olduğu durumlarda substrat inhibisyonu meydana gelir. Bu inhibisyonun değişik nedenleri vardır. Glikoz vb. besinler için oldukça yüksek şeker seviyelerine kadar (100-150 g/L) inhibisyon genellikle görülmez. Derişimin 350-500 g/L'ye ulaştığı durumlarda birçok mikroorganizma için gelişme olanaksızdır. Bunun nedenine ilişkin en uygun açıklama, bu derişimlerde hücrenin dehidrasyona uğramasıdır. Böyle çözeltilerde yalnızca ozmofilik veya ozmotolerant mikroorganizmalar gelişebilir. Benzer durum 40 g/L NaCl derişiminin üzerindeki yüksek tuz çözeltilerinde meydana gelir. Böyle çözeltilerde ise yalnızca halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar gelişebilir. Bu iki örnek bazı gıdaların muhafazalarında çok önemlidir.

Substrat inhibisyonunun görüldüğü durumlarda Monod bağlantısının

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \frac{\mu_{max}\, SX}{Ks + S\,[Ki\,/\,(Ki + S)]} = \frac{\mu_{max}\, SX}{Ks + S\,[1 + (S\,/\,Ki)]} \qquad 02.17$$

ya da

$$\mu = \frac{\mu_{max}\, S}{Ks + S\,[Ki\,/\,(Ki + S)]} = \frac{\mu_{max}\, S}{Ks + S\,[1 + (S\,/\,Ki)]} \qquad 02.18$$

şeklinde yazılabileceği deneysel veriler sonucunda bulunmuştur. Burada K_i substrat inhibisyonuna bağlı ayrışma sabitidir.

Substratın çok düşük olduğu koşullarda K_i yanında S ihmal edilebileceğinden yukarıdaki eşitlikler inhibisyonsuz (baskılamanın olmadığı) koşullar için verilen normal Monod bağıntısına dönüşmektedir.

Çok sık kullanılan besin maddeleri için inhibisyona neden olabilecek limit değerler şöyledir: Amonyum iyonu 5 g/L, fosfat tuzları 10 g/L, nitrat 5 g/L, etanol 10 g/L ve glikoz 100 g/L.

02.05.02. Hücre ve Ürün Oluşumuna İlişkin Verim Katsayıları

Mikroorganizmaların gelişmeleri ve ürün oluşturmaları, biyodönüşüm işlemleridir. Burada fermantasyonu besleyen kimyasal besin maddeleri, hücre kütlesi ve metabolitlere dönüşür. Besin maddeleri ve enerji kaynakları ile oluşan hücre kütlesi ve ürünler arasındaki bağlantıları açıklamak için verim etkinliğinin bilinmesi gereklidir. Sözü edilen biyodönüşümler, tüketilen her birim besin maddesine karşı oluşan ürün veya hücre kütlesi olarak ifade edilen verim katsayıları şeklinde nicel (kantitatif) olarak belirtilebilirler.

$Y_{x/s}$: hücre kütlesi için ve $Y_{p/s}$: ürün için kullanılan verim katsayılarıdır.

Verim katsayıları belirli bir zaman diliminde tüketilen substratın, oluşan ürünün ve hücre kütlesinin ölçümleri ile hesaplanır.

$$Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S \qquad 02.19$$

$$Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S \qquad 02.20$$

Yukarıdaki değerler, gözlemlenen verim katsayılarını ifade eder. İlgili substrat üzerinden hücre kütlesi ve ürünlerin teorik verimlerini hesaplamak da mümkündür. Teorik hücre veriminin anlamı üzerinde hâlâ tartışılmakta ise de bu değerler denemeleri düzenlemede ve sonuçları yorumlamada standart bir ölçü olarak değer kazanırlar.

Karbon veya enerji kaynağı üzerinden teorik hücre verimini hesaplamak için yaygın olarak kullanılan iki yöntem vardır. Bunlardan biri mevcut elektronlar, diğeri ATP'nin sabit verim kavramı üzerinden hesaplanır.

Teorik ürün veriminin hesaplanması ise ürün oluşumu için bazı sitokiyometri bilgileri gerektirir. Bunun için glikozun etanole dönüşü örnek alınırsa;

$$\underset{180}{\text{Glikoz}} \rightarrow \underset{2 \times 46}{2\,C_2H_5OH + 2CO_2}$$

Maksimum dönüşüm 2 mol etanol/1 mol glikoz veya 0,51 g etanol/g glikozdur. Genel uygulamada substratın bir kısmı hücre kütlesi ve diğer yan ürünlerin oluşumunda harcandığı için bu teorik verime ulaşılamaz, fakat çok yakın olabilir. Etanol üretiminde teorik verimin %90-95'ine kolaylıkla ulaşılabilir. Aminoasitler ve antibiyotikler için stokiyometri daha karmaşıktır ve teorik verimin hesaplanması daha zordur.

02.05.03. Substrat Kullanımı ve Ürün Oluşumunun Kinetiği

Metabolik ürünlerin oluşumu, besin maddelerinin tüketilmesi ile doğrudan ilişkilidir. Buna rağmen hücreler olmaksızın ürün oluşumu meydana gelmez. Böylece gelişme ve ürün oluşumunun birlikte besin maddeleri tüketimi ile ilişkili oldukları söylenebilir.

Verim katsayıları ile ilgili eşitliklerde biyokütle veya ürünün artmasına karşılık substratın azalmasını göstermek için önlerine (-) işaret konulabilir. Böylece;

$$-Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S \qquad 02.21$$

$$-Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S \qquad 02.22$$

bağıntıları elde edilir. Daha önceki bilgilerden;

$$dX / dt = \mu X \qquad 02.23$$

olduğu göz önüne alınarak hücre kütlesi ile ilgili bu iki bağıntının birleştirilmesi ile

$$(-YdS / dt) = \mu X \qquad 02.24$$

eşitliği elde edilir. Son eşitliğe göre, kesikli kültürlemede zamana göre substratın tüketilme hızı için aşağıdaki bağıntı geçerli olur:

$(-dS / dt) = (\mu / Y) X$ 02.25

Bazı durumlarda μ/Y terimi q_s ile gösterilir ve buna "özgül metabolik hız" veya "özgül substrat kullanım hızı" denir. Buna göre 02.25'teki eşitlik;

$(-dS / dt) = qsX \Rightarrow qs = (1/X)(-dS / dt)$ 02.26

şeklinde yazılabilir.

Monod bağıntısında eşitliğin her iki tarafı Y ile bölünürse;

$\mu / Y = [(\mu_{max} S) / Y] / (Ks + S)$ 02.27

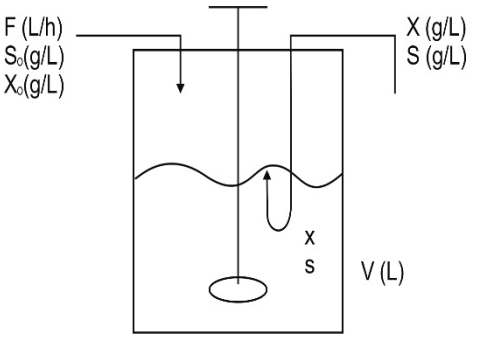
buradan da

$q_s = (q_{smax} S) / (Ks + S)$ 02.28

bağıntısı elde edilir. Substrat kullanım hızı belirtilirken bunun ortamdaki hangi substrata ait olduğunun belirlenmesi ve bu nedenle q_s "g substrat.g^{-1} biyokütle. h^{-1}" şeklinde gösterilmesi gerekir (örneğin $q_{(glikoz)}$).

q_p ise özgül ürün oluşum hızı olup q_p ; "g ürün.g^{-1}biyokütle.h^{-1}" şeklinde ifade edilir.

En basit sürekli kültür sistemi olan kemostat (Şekil 02.05) içerisindeki kimyasal değişimleri açıklayabilmek için ortam akış hızındaki değişkenlikten bağımsız olarak sınırlayıcı besin derişimi ve hücre ile ilgili bazı eşitlikler tasarlamak gereklidir. Burada X_0 ve X, sırasıyla besleme ve fermentör içerisindeki hücre kütlesi (g/L); S_0 ve S, sırasıyla besleme ve fermentör içerisindeki substrat derişimi; F, ortam besleme hızı (L/h); V, fermentör hacmi (L); μ, özgül gelişme hızı; t ise süre (h)'dir.



Şekil 02.05. Tek kademeli kemostat

Hücre Gelişmesi

Substrat kullanımı ve ürün oluşumuna ilişkin materyal denge eşitlikleri yazılacak olursa gelişme

$(F / V) X_0 - (F / V)X + \mu X = (dX / dt)$ 02.29

Hücre girişi - Hücre çıkışı + Hücre çoğalması = Hücre birikimi

Genellikle besin akışı sterildir ve X_o= 0'dır. Böylece Eşitlik 02.29, Eşitlik 02.30'da görüldüğü şekilde basitleştirilebilir;

$$-(F / V)X + \mu X = (dX / dt) \qquad 02.30$$

Sonuç olarak, yatışkın durumda $(dX / dt) = 0$ olduğundan

$$\mu = F / V \qquad 02.31$$

şeklinde yazılabilir. Böylece; özgül gelişme hızı ortamın akış hızının kültür hacmine bölünmesi ile belirlenir. Bu oran dilüsyon hızı (D) olarak belirtilirse

$$D = F / V = \mu \qquad 02.32$$

böylece yatışkın durumda özgül gelişme hızı dilüsyon hızına eşittir (μ= D).

Substrat Kullanımı

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} S_O - \frac{\mu X}{Yx / s} - \frac{qpX}{Yp / s} - mX - \frac{F}{V} S \qquad 02.33$$

Substrat birikimi = Substrat beslemesi - Gelişme - Ürün sentezi - Muhafaza - Ayrılan substrat

Burada $Y_{x/s}$ ve $Y_{p/s}$ sırasıyla, hücre verim katsayısı ve ürün verim katsayısı; q_p özgül ürün oluşum hızıdır.

Ürün Oluşumu

$$(dP / dt) = q_p X - (F / V)P - KP \qquad 02.34$$

Ürün birikimi = Ürün sentezi - Ayrılan ürün - Parçalanan ürün

Bu eşitlikler yatışkın olan veya olmayan fermantasyonların her ikisi için de geçerlidir. Buna rağmen yatışkın olmayan sürekli fermantasyonlarda çözüm daha zordur.

Eğer ürün işleme sürecinde substrat beslemesi veya kesikli kültürde olduğu gibi dışarıya ürün akışı yoksa karbon veya enerji kaynağının (substrat) kullanımına ilişkin olan eşitlik 02.35 şöyle olur:

$$\frac{-ds}{dt} = -\frac{\mu X}{Yx / s} - \frac{qpX}{Yp / s} - mX \qquad 02.35$$

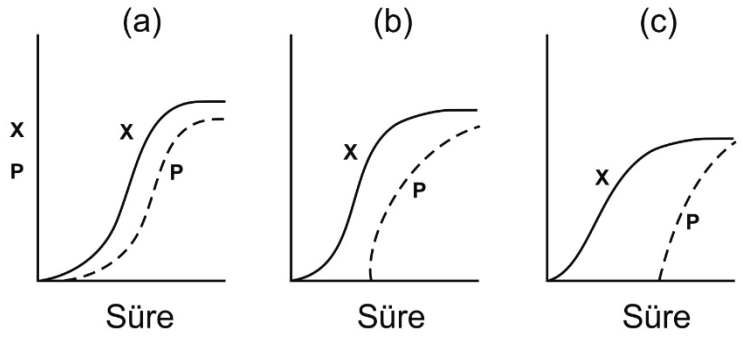
Buradan genellikle en pahalı ortam bileşeni olan karbon kaynağının, ürün sentezine olduğu kadar hücre kütlesi sentezi ve muhafaza için de harcanacağı ortaya çıkar.

Burada hacimsel verimlilik (V_p; $gL^{-1}h^{-1}$) ve özgül hız ($g.g^{-1}$biyokütle.h^{-1}) olarak ifade edilen iki terim açıklanmalıdır. Hacimsel verimlilik, hücre kütlesi derişimine bağımlıdır ve fermantasyon biriminin yöneticisi için çok önemlidir.

Çünkü her birim, fermantasyon kapasitesi için materyal isteğini ya da ürünün sentez hızını tanımlar. Özgül hız (q), hücre kütlesi konsantrasyonuna bağımlı değildir ve ürün sentezi veya materyal kullanımında hücrelerin etkinliğini belirtir. Özgül hız, özellikle fermantasyonlar arasındaki sonuçların karşılaştırılmasında ve hangisinin daha etkin olduğunun ortaya konmasında yararlıdır.

Gelişme ve ürün oluşumu arasındaki kinetik ilişki, ürünün hücre metabolizmasındaki rolüne bağlıdır. En yaygın olarak karşılaşılan iki kinetik model, gelişme sırasındaki ve gelişme tamamlandıktan sonraki ürün sentezlerini açıklayan modellerdir (Şekil 02.06 a ve c). Daha az yaygın olan bir model ise başlangıçta ürün oluşmaya başlamadan gelişmenin görüldüğü ve belli bir süre sonra gelişme devam ederken ürünün sentezlenmeye başlandığı durumlar için uygulanır (Şekil 02.06 b).

Gelişme sırasındaki ürün sentezi genellikle glikozun etanole fermantasyonunda olduğu gibi katabolik bir yol izinin asıl ürünü şeklinde gerçekleşir veya bunlar, aminoasitler ve vitaminler gibi normal ara metabolitler olarak üretilirler. Primer (birincil) metabolitlerin üretim hızı, doğrudan çoğalmaya bağlıdır ve aşağıdaki eşitlik ile verilir.

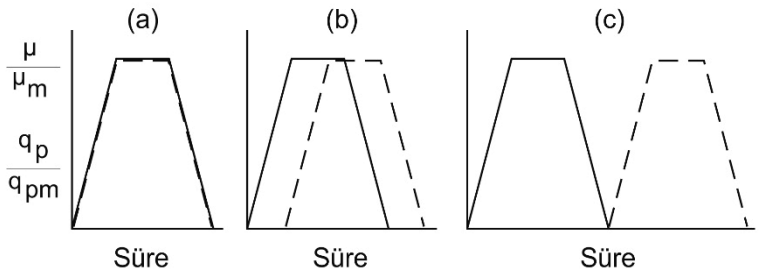


Şekil 02.06. Kesikli kültürde hücre gelişmesi ve ürün oluşumuna ilişkin kinetik modeller

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu X}{Yp\,/\,c} \qquad 02.36$$

Burada $Y_{p/c}$ her gram hücre için gram olarak ürün miktarını göstermektedir.

Özgül gelişme hızı (μ) ve özgül ürün oluşum hızı (q_p) arasındaki ilişki, farklı kinetik modellere göre şekil 02.07'de görülmektedir.



Şekil 02.07. Farklı kinetik modellere göre özgül gelişme hızı (μ) ve özgül ürün oluşum hızı (q_p) arasındaki ilişki

Bazı fermantasyonlarda hücre gelişmesi ve ürün oluşumu, birbirine kısmen bağlıdır. Laktik asit fermantasyonu buna bir örnek olarak verilebilir. Bu model, gelişmenin belli bir aşamasından sonra ürünün sentezlenmeye başlandığı fermantasyonlar (Şekil 02.06 b ve 02.07 b) için genel olarak kullanılabilir.

Hücre gelişmesi ile ilgili olmayan ürünler, genel olarak "sekonder (ikincil) metabolitler" olarak tanımlanır. Gelişme ile ilgili olmayan tüm ürünler, sekonder metabolitler olarak tanımlanırlarsa da sekonder metabolitlerin tümü mutlaka gelişme ile ilgisiz değildir. Bu nedenle sekonder metabolitleri, mikroorganizma çoğalması için gerekli olmayan fermantasyon ürünleri olarak tanımlamak daha anlamlıdır. Gelişme ile ilgili olmayan ürünlere örnek olarak kimi antibiyotikler ve mikotoksinler gösterilebilir. Ürün oluşumunun hücre gelişmesinden ayrı düşünülmesi nedeniyle bu maddelerin oluşum hızı ile çoğalma arasındaki ilişkiyi açıklamak çok zordur. Buna rağmen üretimin özgül hızları (q_p ve q_s) hesaplanabilir. Özgül hızın hesaplanması, hücre derişimi etkisi elimine edildiği (yok varsayıldığı) için verileri kıyaslama ve yorumlamada en yararlı yol olarak görülmektedir.

Ayrıca aynı şekilde substrat kullanım hızı da verilmiş ise dönüşüm verimi hesaplanabilir. Örneğin, karbon kaynağından ürün verimi $Y_{p/s}$ şöyle hesaplanır:

$$Y_{p/s} = q_p / q_s \qquad 02.37$$

Gelişmenin belli bir aşamasından sonra oluşmaya başlayan veya gelişme tamamlandıktan sonra oluşan ürünleri analitik olarak tanımlamak daha zordur. Bu amaçla daha çok deneysel verilere dayalı olarak geliştirilmiş modeller türetilir.

02.05.04. Kesikli Fermantasyonda Verimlilik

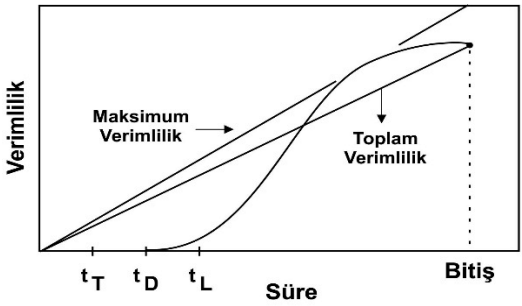
Hacimsel verimlilik (V_p), saatte her litre hacim için g olarak oluşan ürün şeklinde ifade edilir ve prosesin tüm performansının ölçümüdür (V_p; $gL^{-1}h^{-1}$). Kesikli proseste verimliliği tüm işlem süresi için hesaplamak gereklidir. Bu süre yalnızca fermantasyon süresini değil, aynı zamanda fermentörün boşaltılması, yıkanması, sterilizasyonu ve yeni substratın doldurulması için geçen süreleri de kapsar. Bu zaman aralığı, maya üretiminde 6 saat kadar kısa, antibiyotik

üretiminde 20 saat kadar uzun olabilir. Bir partilik fermantasyonun tipik bir analizi Şekil 02.08'de görülmektedir.

Kesikli fermantasyonda süreç verimliliği (overall productivity) fermantasyonun başlama noktasından bitiş noktasına uzatılan bir doğru ile ifade edilir.

Maksimum verimlilik, başlama noktasından gelişme kurvesine teğet olacak şekilde uzatılan benzer bir doğru ile gösterilir.

Fermantasyon için toplam süre eşitlik 02.38'den hesaplanabilir.



Şekil 02.08. Kesikli kültürde verimlilik (t_T değiştirme; geri dönüş, t_D bekleme ve t_L lag fazı süresi)

$$t = \frac{1}{\mu max} \ ln \ \frac{X_f}{X_o} + t_D + t_B + t_L \qquad 02.38$$

Burada t_D, t_B ve t_L sırasıyla değiştirme, bekleme ve lag faz (kesikli kültür ve sterilizasyonu için) süreleri, X_o ve X_f ise sırasıyla başlangıç ve son hücre konsantrasyonlarıdır. Buradan süreç verimliliği "P" aşağıdaki bağıntı (Eşitlik 02.38) ile elde edilir.

$$P = Xf / (\frac{1}{\mu max} \ ln \ \frac{X_f}{X_o} + t_D + t_B + t_L) \qquad 02.39$$

Bu eşitlikten proses değişikliklerinin süreç verimliliği üzerine etkisini belirlemek mümkündür. Fazla inokülüm kullanıldığında X_o artacak ve proses süresi kısalacaktır. Değiştirme ve bekleme sürelerinin azaltılması toplam süreyi kısaltacak, aktif hücreler içeren bir starterin kullanılması ise lag fazı ortadan kaldıracaktır. Ekmek mayası ve glutamik asit üretiminde olduğu gibi fermantasyonun toplam süresi kısa ise (18-48 h) değiştirme süresi, süreç verimliliği üzerinde önemli etkiye sahiptir. Diğer taraftan antibiyotik üretiminde olduğu gibi uzun fermantasyonlarda (150-200 h) birkaç saatlik farklılık fazla önemli değildir.

02.06. Gelişmeye Etki Eden Faktörler

Mikroorganizmaların gelişmeleri ve ürün oluşturmaları çevreye bağımlı olarak meydana gelir. Bu nedenle gelişme ve ürün oluşumunu anlayabilmek için mikrobiyel metabolizmanın düzenlenmesiyle fiziksel ve kimyasal çevre arasındaki ilgiyi anlamak gereklidir.

Bir mikroorganizmanın belirli bir çevrede gelişme ve ürün sentezleme yeteneği öncelikle organizmanın genetik özellikleri ile ilgili olup sonra çevre koşullarının gelişme ve ürün oluşumu için uygunluğuna bağlıdır.

Hücre kütlesindeki veya sayısındaki artış olarak belirtilen gelişme, bazı kimyasal ve fiziksel koşulların uygun olduğu durumlarda meydana gelir. Bu koşullar; kabul edilebilir sıcaklık, pH ve gereksinim duyulan besinlerin mikroorganizmaların yararlanabileceği biçimde ortamda hazır bulunmasıdır.

Mikroorganizmaların gelişmelerini etkileyen başlıca faktörler aşağıda açıklanmıştır.

02.06.01. Beslenme

Bütün mikroorganizmalar gelişmeleri ve çoğalmaları için enerji kaynağına, hidrojen veya elektron vericilerine (donörlerine) ve C asimilasyonu için karbon kaynağına gereksinirler. Mikroorganizmaların beslenme tipinde bu üç temel gereksinim dikkate alınır. Tüm mikroorganizmalar enerjilerini iki temel yolla kazanabilir. *Cyanobacter* spp. ve diğer fotosentez yapan bakteriler güneş ışığını kullanarak enerji sağlarlar ve bunlar "fototrof" olarak tanımlanır.

Diğer mikroorganizmalar ise enerjilerini kimyasal maddelerin oksidasyonu ile kazanırlar ve bunlar "kemotrof" olarak tanımlanırlar. Kemotroflar içinde kimyasal enerjiyi anorganik maddelerin oksidasyonu ile sağlayanların yanında sadece organik bileşikleri okside ederek enerji kazananlar da vardır.

Bütün mikroorganizmalarda hidrojen [H] veya elektron (e^-) sağlayan iki kaynak vardır. Eğer organik bileşikler [H] veya elektron vericisi olarak görev yapıyorsa mikroorganizma "organotrof", hidrojen ve elektronlar indirgenmiş anorganik element ve bileşiklerden (S, H_2S, NO_2^-, Fe^{+2}, H_2, CO) sağlanıyorsa "litotrof" olarak tanımlanır. Bu beslenme tipleri özet olarak Çizelge 02.03'te gösterilmiştir.

Mikroorganizmanın gelişme ortamı içerisinde mikroorganizmanın biyosentezini ve diğer faaliyetlerin en iyi olmasını sağlayacak gerekli besin maddeleri bulunmalıdır. Gereksinim duyulan besin maddelerini yeterli miktarda ve uygun formlarda içeren bir besiyeri, gelişme için ilk koşuldur. Gelişme ortamının kimyasal bileşimi, hücre ve ürün sentezi için elementel gereksinimlerin tümünü karşılamasının yanı sıra hücre muhafazası ve metabolik faaliyetler için gerekli enerjiyi de sağlamalıdır.

Buradan da anlaşılacağı gibi mikrobiyel aktivite için iki önemli beslenme faktörü vardır:

-Hücre metabolizması için gerekli enerji kaynakları,

-Hücreyi oluşturan ve ürünlerin biyosentezi için gerekli olan madde kaynakları.

Çizelge 02.03. Mikroorganizmalarda beslenme tipleri

Beslenme tipi	Enerji Kaynağı	Hidrojen/ Elektron Kaynağı	Karbon Kaynağı	Örnekler
Fotolitotrof-ototrof	Işık	Anorganik [H] ya da e^- donör	CO_2	Algler, *Cyanobacter* spp., Purpur sülfür bakterileri, Yeşil sülfür bakterileri
Fotoorganotrof-heterotrof	Işık	Organik [H] ya da e^- donör	Organik bileşikler	Purpur non-sülfür bakterileri, Yeşil non-sülfür bakterileri
Kemolitotrof-ototrof	Anorganik bileşikler	Anorganik [H] ya da e^- donör	CO_2	Nitrifikantlar, Sülfürikantlar, Hidrojen bakterileri, Demir bakterileri
Kemoorganotrof-heterotrof	Organik bileşikler	Organik [H] ya da e^- donör	Organik bileşikler	Diğer bütün bakteriler funguslar, Protozoa

Mikroorganizmalar gereksinimleri olan enerjiyi ortamda bulunan bazı bileşiklerin kimyasal bağlarındaki depolanmış enerjiyi kullanarak sağlarlar. Bunlar organik veya inorganik maddeler olabilir. En iyi enerji kaynakları karbohidratlardır.

İkinci beslenme faktörü ise biyokütle oluşumu ve biyosentez için gerekli olan C, H, O, N, P ve S gibi ana elementler ve iz elementlerdir. Bunlar substrat içinde basit bileşikler halinde bulunabileceği gibi kompleks bileşikler halinde de bulunabilirler.

Mikroorganizmaların besin istekleri yüksek yapılı organizmalara kıyasla genel olarak daha azdır. Değişen çevre şartlarına göre metabolizmalarını kolayca değiştirebilirler. Farklı gelişme evrelerinde besin istekleri farklıdır. Spor evresinde mikroorganizmaların besin istekleri en az düzeyde olup gelişme ve çoğalma evresinde önemli ölçüde besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Herhangi bir mikroorganizmanın besinlerden yararlanma yeteneği, genetik yapısına ve sahip olduğu enzim sistemlerine bağlıdır. Besin gereksinimi açısından en düşükten en yükseğe doğru sıralama yapıldığında küfler, mayalar, Gram negatif bakteriler ve Gram pozitif bakteriler sayılabilir.

Mikroorganizmanın gelişme ortamı içerisinde bulunması gereken bileşenler temel işlevlerine göre karbon kaynakları, azot kaynakları, inorganik bileşikler ve vitaminler olarak gruplandırılır. Karbohidratlar içerisinde özellikle glikoz, früktoz ve galaktoz gibi monosakkaritler, sakkaroz ve laktoz gibi disakkaritler, çoğu mikroorganizma tarafından kolaylıkla kullanılabilir.

Mikroorganizmalar içinde pek azı nişasta ve selüloz gibi kompleks karbohidratları basit şekerlere parçalayarak enerji kaynağı olarak kullanabilir. Bunun nedeni, bu büyük moleküllü bileşikleri temel yapı taşları olan şekerlere indirgeyecek enzim sisteminin olmamasıdır. Yağlar da mikroorganizmalar tarafından kullanılır, ancak bu bileşikleri parçalayarak kullanan mikroorganizma sayısı yine azdır. Heterotrof mikroorganizmalar tarafından kullanılan başlıca azot kaynağı aminoasitlerdir. Bu amaçla diğer azotlu bileşiklerden de yararlanmaktadırlar. Örneğin bazı mikroorganizmalar nükleotitleri ve serbest aminoasitleri, bazıları ise peptit ve proteinleri kullanırlar.

Genel olarak, aminoasitler gibi basit bileşikler, hemen hemen tüm mikroorganizmalar tarafından yüksek molekül ağırlığına sahip proteinlere kıyasla öncelikli olarak kullanılırlar. Bunun temel nedeni, yüksek molekül ağırlığına sahip kompleks bileşiklerin hücre fonksiyonlarında kullanılabilmesi için bunların daha basit moleküllere parçalanma gereği ve bunun için de ilave enerji kullanımı gereğidir. Ortamda basit bileşikler kalmadığında proteinler gibi yüksek moleküllü bileşikler parçalanmaya başlar. Aynı durum polisakkaritler ve yağlar için de geçerlidir. Mikroorganizmalar, düşük miktarda da olsa B vitaminlerine gereksinim duyabilirler.

Doğal gıdaların çoğunda bu maddeler mikroorganizmaların gereksinimlerini karşılayacak kadar bulunmaktadır. Genel olarak Gram pozitif bakteriler bu bileşikleri sentezleyemedikleri için bir veya daha fazlasını gelişme ortamından almak zorundadırlar. Gram negatif bakteriler ve özellikle küfler bu gereksinimlerinin çoğunu veya tamamını sentezleyebilecek yetenektedirler.

02.06.02. Su Aktivitesi

Su aktivitesi, gıdalarda bulunan suyun kullanılabilirliğini gösteren termodinamik bir özelliktir.

Mikroorganizmalar sulu ortamlarda gelişir, susuz ortamda canlılıklarını sürdürebilir, ancak çoğalamazlar. Bu özellikleri, çok uzun zamandan bu yana gıda koruma yöntemlerinden biri olarak kullanılmış ve gıdalar kurutularak dayanıklı hale getirilmişlerdir. Gıda kurutma, 18. yüzyılda endüstrileşmiştir.

Su, canlılar için mutlak gerekli olan bir maddedir. Her canlı az ya da çok olmak üzere suya gerek duyar. Su, sadece besin maddelerinin hücreye alınması için değil, aynı zamanda hücre içinde biriken metabolitlerin hücre dışına atılması için de gereklidir.

Mikroorganizmalar içinde suya en fazla gerek duyanlar alglerdir. Bunu sırası ile bakteri ve mayalar izler, küfler suya en az gerek duyanlardır.

Su aktivitesi (A_s, S_a, a_w), bir gıda maddesindeki su buharı basıncının aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncına oranı olarak tanımlanmakta ve aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır:

Su aktivitesi ($A_s = a_w = S_a$) = P / P_0 = %Bağıl nem /100

Burada;

P: Gıdadaki suyun buhar basıncı

P_0: Aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncı

Bağıl nem: Gıdaların atmosferden aldığı veya verdiği suyun nispi nem dengesi

Saf suyun su aktivitesi 1 olup, herhangi bir çözeltide çözünen madde derişimi arttıkça çözeltinin A_s değeri 1'in altına inmektedir. Gıda maddesindeki suyun buhar basıncının (P) değişmesine neden olan her faktör, su aktivitesinin de değişmesine neden olmaktadır. Örneğin kuru maddenin artışı, su aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Mikroorganizma, ancak serbest haldeki sudan yararlanabileceği için suda çözünen madde miktarı arttıkça serbest su molekülleri azalacak ve mikroorganizma, artık bu bağlı sudan yararlanamayacaktır.

Buna göre su aktivitesi değeri, bir ortamdaki mikroorganizmaların yararlanabileceği suyun miktarını gösterir.

Mikroorganizmaların gelişebilmeleri için gereksinme duydukları A_s değerleri farklıdır. Genel olarak bakteriler gelişebilmek için maya ve küflerden daha yüksek su aktivesine gereksinme duyarlar (Çizelge 02.04).

Su aktivitesi değeri ile ozmotik basınç arasında ters bir orantı vardır. Ortamdaki ozmotik basınç yüksek ise yani kuru madde oranı fazla ise A_s değeri düşüktür.

Her ne kadar nem içeriği düşük olan gıdalar genel olarak daha düşük A_s değerine sahipse ve bunun tersi de geçerli ise de bu iki kavram arasında tam bir ilişki (korelasyon) yoktur. Şeker, tuz ve pektin gibi maddeler gıdadaki serbest suyu bağlayarak mikroorganizma gelişmesini engellerler. Örneğin %50-60 nem içeren reçel ve marmelatlarda A_s 0,75 kadardır. Tuz, şekere kıyasla 6 kez daha fazla su bağlama kapasitesine sahiptir.

Gıdalardaki serbest (yarayışlı) su miktarı azaltılarak mikrobiyel gelişme kontrol altına alınabilir.

Denge nem miktarı, ortamın sıcaklık ve bağıl nemine bağlı olarak değişir. Sabit sıcaklıkta farklı bağıl nemdeki ortamlarda tutulan örneklerin denge nem miktarları, ortamın % bağıl nemlerine karşı (veya su aktivitesi) grafiğe alındığında sorpsiyon izotermi elde edilir. Sorpsiyon, adsorpsiyon ve desorpsiyon izotermlerinin her ikisini de belirlemek için kullanılan bir deyimdir.

Çizelge 02.04. Mikroorganizmaların gelişme için gereksinim duydukları minimum A_s değerleri ve gıda örnekleri

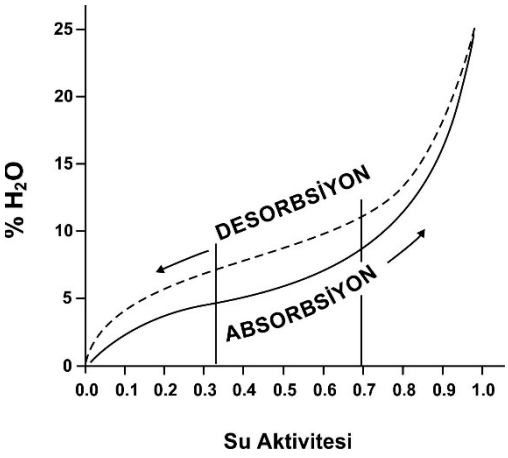
A_s	Bu A_s değerinde gelişebilen mikroorganizmalar	Gıda örnekleri
0,95	*E. coli*, *Clostridium perfringens*, pek çok çürükçül organizma, bazı mayalar	Çabuk bozulan gıdalar (taze ve konserve meyve, sebze, et, balık), süt, pişmiş sosis, ekmek, %4 sakkaroz veya %7 NaCl içeren gıdalar
0,91	*Salmonella* spp., *Cl. botulinum*, *Lactobacillus* spp., bazı küfler	Bazı peynirler, kürlenmiş et, meyve suyu konsantreleri, %55 sakkaroz veya %12 NaCl içeren gıdalar
0,87	Mayaların çoğu	Fermente sosisler, bazı kekler, sert peynirler, margarin, %65 sakkaroz veya %15 NaCl içeren gıdalar
0,80	Küflerin çoğu, *Saccharomyces* spp., *Staphylococcus aureus*	Çoğu meyve suyu konsantreleri, koyulaştırılmış süt, şurup, un, yüksek şekerli kekler, bazı kurutulmuş etler
0,75	Halofilik bakterilerin çoğu, mikotoksijenik *Aspergillus* spp.	Reçel, marmelat, meyveli şekerlemeler, badem ezmesi, bazı bisküviler, bazı kurutulmuş etler
0,65	Bazı küfler	%10 nemli yulaf ezmesi, jöle, pekmez, fındık
0,60	Ozmofilik mayalar ve kserofil küfler	%15-20 nemli kurutulmuş meyveler, karamel, şekerleme, bal
0,50	Mikroorganizma gelişmesi olmaz	%12 nemli makarna, %10 nemli baharat
0,40		%5 nemli tam yumurta tozu
0,30		Bisküviler, kraker, %3-5 nemli kurutulmuş ekmek
0,20		%2-3 nemli tam yağlı süt tozu, kurutulmuş çorbalar

Sorpsiyon işlemi tersinir değildir. Bu nedenle denge nem miktarı, dengeye ulaşma yönüne de bağlıdır. Tamamen kuru maddenin nem kazanarak dengeye ulaşması sonucu çizilen izoterm, adsorpsiyon izotermi; nemli bir maddenin nem kaybederek dengeye ulaşması sonucu çizilen izoterm ise desorpsiyon izotermi olarak tanımlanır.

Gıdaların korunmasındaki temel yöntemlerden olan kurutma, tuzlama ve reçelde olduğu gibi yüksek oranda şeker katılmasının amacı, gıdanın su aktivitesi değerini düşürmektir.

Gıdada su aktivitesinin düşürülmesi öldürücü değildir. Örneğin, süttozunda canlılık, daha yüksek su aktivitelerine göre daha fazla korunur. Kültür koleksiyonunda mikroorganizmalar liyofilizasyon tekniği ile kurutularak korunurlar. Şekil 02.09'da sorpsiyon izotermi verilmiştir.

Adsorpsiyon izotermi, kurutulmuş materyalin (gıda) belirli bağıl nemdeki ortamlarda tutulması ve nem kazancına bağlı ağırlık artışının saptanmasıyla çizilir.



Şekil 02.09. Sorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon izotermi, ürünlerin nem çekme özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Desorpsiyon izotermi ise başlangıçta nemli gıda maddesinin aynı ortamlarda tutulması ve nem kaybının saptanmasıyla belirlenir.

Gıda mikrobiyolojisi açısından bu izotermlerin önemi; gıdaların kurutulması, kurumuş gıdanın nem çekmesi ve mikroorganizma gelişmesinin engellenmesidir. Özellikle engeller teknolojisinde gıdanın nemi, sıklıkla değerlendirmeye alınan bir ölçüttür (bknz⇒ 12. Gıda Güvenliği bölümü).

02.06.03. Sıcaklık

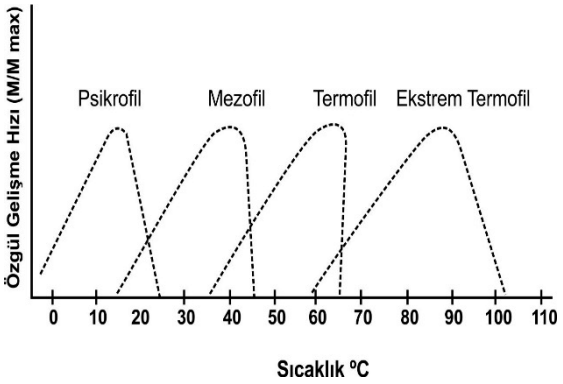
Tüm canlı türleri için gelişmenin en uygun (optimum) olduğu bir sıcaklık derecesi vardır. Bu sıcaklık derecesinde o tür, en aktif olarak en yüksek hızla gelişir ve çoğalır. Generasyon süresi (bakterilerde ikiye bölünme için geçen zaman) en kısadır. Optimum sıcaklıktan sapma olduğunda generasyon süresi uzar. Çoğalmanın halen çok yavaş olsa da gerçekleştiği en düşük (minimum) ve en yüksek (maksimum) sıcaklık dereceleri dışında çoğalma olmaz. Mikroorganizmalarda minimum gelişme sıcaklığı altında ölüm nadir olarak gerçekleşir, hatta kültür koleksiyonu amacıyla mikroorganizmalar dondurulur. Maksimum gelişme sıcaklığı üzerindeki sıcaklıklar öldürücü etki yapar. Bu sıcaklık ne kadar yüksek ise öldürücü etki o denli artar.

Sıcaklık, mikroorganizmaların gelişimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Mikroorganizmalar çok geniş bir sıcaklık aralığında gelişirler. Gıdalar üzerinde doğal ya da kontaminant olarak bulunan mikroorganizmaların gelişebildikleri sıcaklık derecelerinin bilinmesi, gıdaların depolanması sırasında seçilecek depo sıcaklıkları hakkında bilgi verir.

Tüm canlılar gelişme optimumlarına göre "psikrofil" (soğukta gelişen), "mezofil" (ılık ortamda gelişen) ve "termofil" (sıcakta gelişen) olan 3 ana grupta toplanır. Çoğu kaynak, psikrofilleri "optimum gelişme sıcaklığı 20 °C altında olanlar", mezofilleri "optimum gelişme sıcaklığı 20-45 °C arasında olanlar" ve termofilleri "optimum gelişme sıcaklığı 45 °C üzerinde olanlar" şeklinde gruplandırır. Psikrofillerin gelişmesi için gereken optimum sıcaklığı 15 °C ya da daha altında ama maksimum gelişme sıcaklığını 20 °C şeklinde nitelendiren kaynaklar da vardır. Mezofiller için optimum gelişme sıcaklığı genel olarak 28-30 °C olarak kabul edilmekle birlikte *E. coli*, *Salmonella* spp. ve diğer pek çok mezofil bakteri için optimum gelişme sıcaklığı 37 °C'tır.

Şekil 02.10'da 4 değişik gelişme sıcaklığı kurvesi verilmiştir. Pek çok istisnası varsa da gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren pek çok mikroorganizma, 20-30 °C sıcaklık sınırının içerisinde gelişir. Ayrıca çoğu mikroorganizma da bu gruplardan birinin/ birden fazla grubun içerisindedir.

Çizelge 02.05'te bu grupların gelişebildiği minimum, optimum ve maksimum sıcaklık değerleri gösterilmiştir.



Şekil 02.10. Psikrofil, mezofil, termofil ve ekstrem termofil mikroorganizmalar için tipik gelişme kurveleri

Çizelge 02.05. Psikrotrof, psikrofil, mezofil ve termofillerin gelişebildiği minimum, optimum ve maksimum sıcaklık değerleri (°C)

Grup	Sıcaklık °C		
	Minimum	Optimum	Maksimum
Termofiller	40 – 45	55 – 75	60 – 90
Mezofiller	5 – 15	30 – 45	35 – 47
Psikrofiller	-5 – 5	12 – 15	15 – 20
Psikrotroflar	-5 – 5	25 – 30	30 – 35

Mikroorganizmalar, sadece bu gruplar içinde toplanamaz ya da bir diğer deyiş ile sıcaklık sınırları bu denli keskin değildir. Tüm canlılar için geçerli olmak üzere, kimi türlerin sıcaklık toleransı çok yüksek, kimilerininki dardır. "Termostabil", "termotolerant" ya da "eurythermal" olarak adlandırılan mikroorganizmalar, geniş bir sıcaklık sınırında yaşarlar. Bunlar, aslen mezofil karakterli olmakla beraber kimileri psikrofillerin kimileri de termofillerin gelişebildiği sıcaklıklarda gelişebilirler. Mezofil olmakla birlikte psikrofillerin gelişebileceği sınırda gelişenler, psikrotrof olarak tanımlanır.

0-42 °C'ta[2] gelişebilen *Yersinia enterocolitica*, tipik bir psikrotroftur. Mezofil olmasına rağmen termofillerin gelişebildiği sıcaklıklarda da gelişebilen *Streptococcus thermophilus* ise tipik bir termodurik bakteridir. "Termolabil" ya da "stenothermal" olarak adlandırılanlarda ise minimum-maksimum sıcaklık sınırlarına tolerans çok dardır.

Gıda mikrobiyolojisi açısından asıl önemli olanlar termostabil olanlardır. Geniş bir sıcaklık aralığında gelişebildikleri için gıdaların bozulmasından sorumlu olduklarının yanı sıra sayılarının artmasına bağlı olarak gıda kaynaklı hastalıklara neden olma potansiyelleri de yükselir. Bazı patojenlerin gelişme sıcaklıkları çizelge 02.06'da verilmiştir.

Çizelge 02.06. Bazı patojenlerin gelişme sıcaklıkları (°C)

Bakteri	Minimum	Optimum	Maksimum
Bacillus cereus	5	28 – 40	55
Campylobacter spp.	32	42 – 45	45
Clostridium botulinum tip A ve B gelişme	10 – 12	30 – 40	50
Cl. botulinum tip E gelişme	3 – 3,3	25 – 37	45
Cl. botulinum tip A toksin oluşturma	4	37	50
Cl. botulinum tip B toksin oluşturma	3	37	50
Cl. botulinum tip E ve F toksin oluşturma	4	29	45
Clostridium perfringens	12	43 – 47	50
Enterotoksijenik *E. coli*	7	35 – 40	46
Listeria monocytogenes	0	30 – 37	45
Salmonella spp.	5	35 – 37	45 – 47
Staphylococcus aureus gelişme	7	35 – 40	48
Staphylococcus aureus toksin oluşturma	10	40 – 45	46
Shigella spp.	7	37	45 – 47
Vibrio cholerae	10	37	43
Vibrio parahaemolyticus	5	37	43
Vibrio vulnificus	8	37	43
Yersinia enterocolitica	-1	28 – 30	42

[2] Mikroorganizmaların gelişebildiği minimum, optimum ve maksimum sınırlar, farklı kaynaklarda farklı değerlerle verilmektedir. Bu değerler, diğer tüm koşulların optimum olduğu ortamlarda hesaplanır. Farklı kaynaklarda farklı değerlerin verilmesinin asıl olarak 2 nedeni vardır: Diğer tüm koşulların optimizasyonundaki farklılıklar ve suş farklılıkları. Buna göre *Yer. enterocolitica* örneğinde olduğu gibi minimum-maksimum gelişme sıcaklığı, farklı kaynaklarda -0,1 - 44 °C arasındaki değerlere de rastlanılabilir.

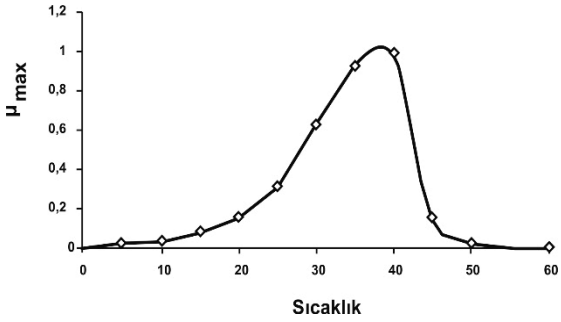
Psikrofiller, hücre membranlarındaki lipitler sayesinde soğuğa tolerans gösterirler. Ayrıca "antifriz proteinleri" ile 0 ^{o}C altında canlılıklarını koruyabilir ve hatta yavaş da olsa gelişebilirler. Antifriz proteinler, buzun kristal yapısını değiştirir ve yeniden kristalleşmesini önleyerek hücreyi korurlar.

Düşük sıcaklık derecelerinde gelişen psikrofil ve psikrotrof bakterilerin sayımı ISO 17410'a göre yapılır. Günlük ve standart uygulamada inkübasyon sıcaklığı 6,5 ^{o}C ve süre 10 gündür. 4,5 ^{o}C'ta 14 günlük inkübasyon da uygulanmaktadır.

Termofiller, fakültatif (ılımlı) ve obligat (zorunlu) olarak 2 grupta toplanırlar. Zorunlu termofiller, ekstrem termofiller olarak da anılır. Fakültatif termofiller için en düşük gelişme sıcaklığı 40 ^{o}C'tır ve optimum 50-60 ^{o}C arasında çoğalırlar. Ekstrem termofiller için optimum gelişme sıcaklığı 80 ^{o}C ve üzerindedir ancak bu grup içinde gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren mikroorganizmalar yoktur.

Isıya dayanıklı sporlar gerek mezofil gerek termofil türler tarafından oluşturulabilir.

Psikrofil ve psikrotrof karakterli mikroorganizmalar ise soğukta depolanan gıdalarda bozulmalara yol açarlar. Sıcaklık, optimum gelişme sıcaklığına doğru yükseldikçe 10 ^{o}C'lık bir sıcaklık aralığında gelişme hızı yaklaşık 2 kat artar. Optimum gelişme sıcaklığının üzerinde artan sıcaklıkla birlikte gelişme hızı, hızla düşer (Şekil 02.11).



Şekil 02.11. Minimum, optimum ve maksimum gelişme sıcaklığı örneği

Gıda mikrobiyolojisi açısından *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces flavus* ve *Eupenicillium brefeldianum* ısıya dayanıklı küfler olarak bilinir ve ısıl işlem görmüş meyve ürünlerinde sorunlara neden olurlar.

Bacillus ve *Clostridium* cinslerine ait bakteri türlerinin sporları da gıda sanayisinde yetersiz ısıl işlem uygulamalarına direnç göstererek bozulmalara ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olurlar. Termofilik asidofilik karakterli *Alicyclobacillus* spp., özellikle elma suyu konsantrelerinde istenmeyen bozulmalara yol açar.

Mikroorganizmaların gelişmeleri ve ürün oluşturmaları, bir dizi kimyasal tepkimenin sonucudur ve tüm kimyasal tepkimelerde olduğu gibi sıcaktan etkilenirler. Genel bir gelişme modeli, aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

$$dX / dt = \mu X - \alpha X \qquad 02.40$$

veya

$$(1 / X)\ (dX / dt) = \mu - \alpha \qquad 02.41$$

Burada α, özgül ölüm hızıdır. Bu eşitlikte görülen özgül gelişme hızı, gelişme ve ölüm arasındaki bir dengedir. Genellikle mikroorganizmalar $\mu > \alpha$ olduğu zaman gelişirler ve bu aşamada α ihmal edilebilir. Buna rağmen gerek μ gerekse α sıcaklığa oldukça bağımlı olduklarından burada her ikisi de birlikte düşünülmelidir.

Gelişme ve gelişme hızları Arrhenius eşitlikleri ile açıklanabilir:

$$\mu = Åe^{-Ea/RT} \qquad 02.42$$

ve

$$\alpha = Ă'e^{-Ea'/RT} \qquad 02.43$$

Burada *Å* ve *Å´*: Arrhenius sabitleri; Ea ve Ea´: aktivasyon enerjileri; R: gaz sabiti (1,987 cal/ mol ^{o}K); T: mutlak sıcaklık (^{o}K)

Tipik aktivasyon enerjisi gelişme için 15-20 k.cal/mol, ölüm için 60-70 k.cal/mol'dür. Buradan ölüm hızının sıcaklığa karşı gelişme hızından daha duyarlı olduğu anlaşılmaktadır.

Mikroorganizmaların ürün oluşturmaları da gelişmedekine benzer şekilde sıcaklığa bağımlıdır. Buna rağmen gelişme ve ürün oluşumu için optimum sıcaklıklar aynı olmayabilir ve ayrı ayrı saptanmalıdır.

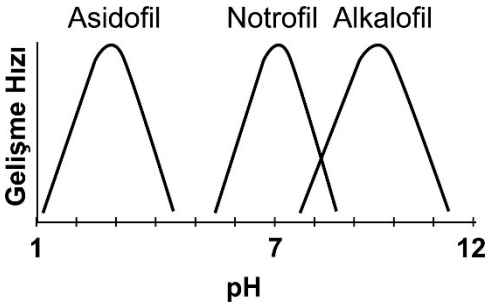
Sıcaklığın optimum değerin üzerine çıkmasıyla hücre verimi hızla azalır. Sıcaklık yükseldiğinde hücre veriminin azalmasının en önemli nedeni, hücrenin muhafaza gereksiniminin artmasıdır. Muhafaza katsayısı artan sıcaklıkla birlikte 15-20 k.cal/mol aktivasyon enerjisi ile artar. Sonuç olarak, gelişme sırasında sıcaklık yükseldiğinde hücrenin muhafaza gereksinimini karşılaması amacıyla karbon ve enerji kaynağı kullanımı da artar.

02.06.04. pH

Mikroorganizmaların çoğaltılması sırasında kültür ortamının pH'sı, gelişme ve ürün oluşumuna etki edecek önemli bir parametredir. Nötral pH'nın (7,0) altındaki bir pH değerinde optimum gelişme gösteren bakteriler "asidofil", pH optimumu 7,0 civarında olanlar "nötrofil", alkali pH'larda en iyi gelişme gösterenler ise "alkalofil" olarak adlandırılır (Şekil 02.12).

Aslen nötrofil olmakla birlikte asidofillerin gelişebildiği sınırlara yakın pH'larda gelişenlere ise asidotolerant denilir. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren mikroorganizmalardan, patojen bakterilerin büyük çoğunluğu nötrofildir. *Vibrio parahaemolyticus*, pH 5,2-7,6 aralığında gelişebilen özel bir örnektir.

Gıda güvenliği açısından pH 4,5 (kimi kaynaklara göre pH 4,4) altındaki gıdalar patojenlerin gelişememesi açısından güvenli olarak kabul edilir.
Pek çok mikroorganizma 3-4 pH birimi aralığına tolerans gösterir. Maksimum gelişme hızı ise çoğunlukla 1-1,5 pH birimi genişliğinde görülür. pH, bu kadar önemli olduğu için çoğu durumda mikroorganizma gelişmesi, tampon ilavesi veya pH kontrol sistemleri yardımı ile kontrol edilir.



Şekil 02.12. Asidofil, nötrofil ve alkalofillerin optimum gelişme pH'ları

Patojenler başta olmak üzere bakteriler, pH bakımından maya ve küflere göre daha seçicidirler. Mikroorganizma gelişmesinin pH'ya bağımlılığı ile ilgili bazı genellemeler yapılabilir. Mikroorganizmaların minimum, maksimum ve optimum pH değerleri çizelge 02.07'de verilmiştir.

Çizelge 02.07. Bazı mikroorganizmaların gelişebildikleri yaklaşık pH değerleri

Mikroorganizma	Minimum	Optimum	Maksimum
Bakteri	4,1 – 4,5	6,5 – 7,5	9,0
Küf	1,5 – 3,5	4,5 – 6,8	9,0 – 11,0
Maya	1,5 – 3,5	4,0 – 6,5	8,0 – 8,5

Bu değerler diğer gelişme parametrelerine bağlı olarak değişebildiğinden kesin sınırlar şeklinde algılanmamalıdır. Örneğin, bazı laktobasillerin gelişebildikleri sınırlar ortamda bulunan aside bağlı olarak değişmektedir.

Çeşitli meyve, meyve suyu, meşrubat, sirke ve şarabın pH değerleri, bakterilerin normal olarak gelişebildikleri pH değerinin altında bulunmaktadır. Bu ürünlerin uzun süre bozulmadan saklanmalarının nedeni büyük oranda pH değerlerine bağlıdır. Meyvelerde genel olarak mikrobiyel bozulmaya pH 3,5'in altında gelişme yeteneğinde olan maya ve küfler neden olur. Bu değer, gıda bozulmalarına yol açan pek çok bakteri ile gıda kaynaklı hastalıklara neden olan tüm bakterilerin gelişebileceği minimum pH değerlerinin oldukça altındadır. Sebzeler, içme sütü, et ve deniz ürünlerindeki pH'nın meyvelere göre yüksek oluşu, bunlarda maya ve küflerle birlikte bakterilerin de bozulmalara yol açabilmesine neden olmaktadır.

Gıda maddelerinin fermantasyon ile veya bazı zayıf asitlerin ilavesi ile asitlendirilerek pH değerlerinin düşürülmesi ve böylece mikrobiyolojik stabilitelerinin artırılması yolu ile muhafaza sürelerinin uzatılması yüzlerce yıldan bu yana uygulanan geleneksel bir yöntemdir.

Genel anlamda mikroorganizmalar ile yapılan üretimlerde kontaminasyon tehlikesini en aza indirecek bir çevre koşulunun yaratılması amacıyla bazen Çizelge 02.07'de açıklanan gelişme pH aralıklarından yararlanılabilir ve bakterilerin gelişmesinin engelleneceği, mayaların gelişebilecekleri bir pH seçimi yapılabilir. Örneğin, pH 3'te yapılan bir maya fermantasyonunda bakteri kontaminasyon riski düşünülmez.

Mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen biyoteknoloji uygulamaları sırasında pH, çeşitli nedenlerle değişme eğilimindedir. Azot kaynağı olarak amonyum kullanıldığında pH düşme eğilimi gösterir. Çözelti içindeki amonyak, amonyum (NH_4^+) halindedir ve mikroorganizma bunu hücre içinde $R\text{-}NH_3^+$ şeklinde birleştirir. Buradaki "R", bir karbon iskeletidir. İşlem sırasında H, ortamda serbest kalır. Azot kaynağı nitrat ise hidrojen iyonları $NO_3^=$'ı, $R\text{-}NH_3^+$'e indirgemek için ortamdan ayrılır ve pH yükselme eğilimi gösterir. pH'daki değişmelerin diğer bir nedeni; laktik asit, asetik asit, sitrik asit vb. organik asitlerin üretimlerinde görülür.

Eğer pH değişikliğindeki en önemli etken biliniyorsa bu değişikliği nötralize etmek için ilave edilen asit veya alkalinin ölçülmesiyle gelişme ve ürün oluşumu üzerine bazı bilgiler elde etmek mümkündür.

02.06.05. Gaz Atmosferi (Oksidasyon-Redüksiyon; O/R Potansiyeli)

Mikroorganizmaların gelişme ortamlarındaki oksidasyon-redüksiyon (O/R) potansiyeline değişik derecelerde duyarlılık gösterdiği uzun yıllardır bilinmektedir. Bir substratın O/R potansiyeli, substratın elektron kazanma veya kaybetme yolunda gösterdiği eğilim şeklinde tanımlanabilir. Bir element veya bileşik, elektron kaybettiğinde substrat yükseltgenir (oksidasyon), elektron kazandığında ise indirgenir (redüksiyon). Aşağıdaki örnek ile bu tepkime açıklanmıştır:

$$Cu \underset{\text{Redüksiyon}}{\overset{\text{Oksidasyon}}{\rightleftharpoons}} Cu + e^-$$

Oksidasyon, aşağıdaki gibi oksijen ilavesi ile de gerçekleşebilir:

$$2Cu + O_2 \longrightarrow 2\,CuO$$

Buna göre elektronlarını kolayca verebilen substrat iyi bir indirgeyici, kolayca elektron kazanan substrat ise iyi bir yükseltgeyicidir. Elektronlar, bir bileşikten diğerine aktarıldığında bu iki bileşik arasında potansiyel bir fark oluşur. Bu farklılık uygun bir alet kullanılarak ölçülebilir ve milivolt (mV) olarak ifade edilir. Madde ne kadar indirgendiyse o kadar negatif elektrik potansiyeli, ne kadar okside olduysa o kadar pozitif elektriksel potansiyeli gösterecektir. Yükseltgeyici (oksidant) ve indirgeyici (redüktant) derişimleri eşit olduğunda elektriksel potansiyel sıfırdır. Bir sistemin O/R potansiyeli Eh sembolü ile ifade edilir.

Aerobik mikroorganizmalar gelişmek için pozitif Eh değerlerine, anaerobik mikroorganizmalar ise negatif Eh değerlerine gereksinim duyarlar.

Mikroorganizmalar oksijen isteklerine göre obligat (zorunlu) aerop, mikroaerofil (kapneik), obligat anaerop, fakültatif anaerop ve aerotolerant anaerop olmak üzere beş gruba ayrılırlar. Başka kaynaklar anaerop mikroorganizmaları kendi içinde obligat anaeroplar ve aerotolerantlar olarak 2 alt gruba ayırır. Çizelge 02.08'de oksijen isteklerine göre mikroorganizma grupları ve oksijenin bu mikroorganizmalar üzerine etkisi gösterilmiştir.

Çizelge 02.08. Mikroorganizmaların O_2 istekleri ve oksijenin etkisi

Grup	Ortam		O_2'nin etkisi
	Aerobik	Anaerobik	
Obligat aerop	Gelişme var	Gelişme yok	Gerekli (aerobik solunumda kullanılır)
Mikroaerofil	Çok yüksek değilse gelişme var	Gelişme yok	Gerekli fakat 0,2 atmosfer basıncın altında olmalıdır.
Obligat anaerop	Gelişme yok	Gelişme var	Toksik etki yapar
Fakültatif anaerop	Gelişme var	Gelişme var	Gelişme için gerekli değil fakat elverişli olduğunda kullanılır
Aerotolerant anaerop	Gelişme zayıf	Gelişme var	Gerekli değildir ve kullanılmaz

Bir gıda maddesinin O/R potansiyelini aşağıdaki özellikler belirler:

-Gıdanın kendine özgü O/R potansiyeli,

-Gıdanın bu potansiyelde meydana gelecek değişimlere karşı gösterdiği direnç (denge kapasitesi),

-Gıdanın çevresindeki atmosferin oksijen gerilimi,

-Gıdayı çevreleyen atmosferin gıda içine girebilme oranı.

Genel olarak gıdaların Eh değerleri +400 mV ile -400 mV arasında değişmektedir. Bazı bakteriler gelişmenin başlaması için indirgenmiş koşullara (Eh -200 mV; *Clostridium* gibi anaerobik bakteriler), diğerleri ise pozitif Eh değerlerine (*Bacillus* gibi aerobik bakteriler) gereksinim duyarlar. Kimi bakteriler hafif indirgenmiş koşullarda daha iyi gelişme gösterirler. Bunlar, mikroaerofil (kapneik) olarak bilinmektedir ve *Campylobacter jejuni* bu grubun tipik üyesidir ve analizinde özel atmosfer koşulları sağlanır. Laktobasiller ve streptokoklar da mikroaerofilik ortamlarda daha iyi gelişirler. *Enterobacteriaceae* üyeleri gibi kimi mikroorganizmalar hem aerobik hem de anaerobik koşullarda (fakültatif

anaeroplar) gelişebilirler. Gıdalarda bulunan küf ve mayaların çoğunluğu aerobik olmakla birlikte içlerinde fakültatif anaeroplar da bulunmaktadır. Küflerin çok büyük çoğunluğu aerop karakter gösterirken mayalar arasında aerop ve fakültatif anaerop olanlar da bulunur. *Clostridium perfringens* aerotolerantlara tipik bir örnektir. Aslen anaerop olmakla birlikte bir miktar oksijen varlığına tolerans gösterir.

Mikroorganizmaların analizinde aerobik ve fakültatif anaeroplar için özel bir uygulamaya gerek yoktur çünkü havadaki O_2 oranı, bu grupların gelişmesi için yeterlidir. Mikroaerofiller için %5-7 O_2 ve %8-10 CO_2 sağlayan kitler kullanılır. Anaeroplar için oksijeni kimyasal olarak bağlayan kitler kullanıldığı gibi ekimi yapılmış malzemenin vakumlu bir desikatöre yerleştirildikten sonra havasının boşaltılması da mümkündür. CO_2 inkübatörleri de bu amaçla kullanılabilir. Tüpte geliştirilecek anaerop mikroorganizmalar için ekimden sonra yüksekliği 1 cm olacak şekilde steril sıvı parafin ya da agar ilave edilmesi yeterlidir. Aerotolerantlar için ideal inkübasyon ortamı anaerop koşulların sağlanması olmakla beraber, örneğin *Cl. perfringens* analizinde, Petri kutusuna ekimden sonra aynı katı besiyerinden (ya da steril su agar) ilave etmek yeterlidir.

Ekimi yapılmış besiyerinin bir desikatöre yerleştirildikten sonra bir mum yakılarak desikatör kapağının kapatılması sonunda mum, içerideki oksijeni bitirinceye kadar yanar (mum kavanozu; candle jar). Mum kavanozu mikroaerofiller, aerotolerantlar ve *Lactobacillus bulgaricus* gibi bazı bakterilerin analizinde uygunsa da zorunlu anaeroplar için kullanılamaz.

02.06.06. İnhibitörlerin Etkisi

Bazı özel bileşikler, hücrenin yapısal bileşenleri veya anahtar özellikteki enzimleri üzerinde toksik etki göstererek inhibisyona (baskılamaya) neden olur ve böylece gelişmeyi yavaşlatır veya tamamen engellerler. Birçok mikroorganizma 1 g/L'nin üzerindeki derişimlerdeki fenol, formaldehit, toluen, metanol vb. bileşiklerin varlığında baskılanır. Buna rağmen eğer derişimleri yeterince düşükse bu bileşikler gelişme için kolaylıkla kullanılabilirler.

Bu tür engelleyici etki gösteren inhibitörler, mikroorganizmaların bünyelerine girebilmeleri yönünden bazen substratlarla rekabete girebilir ve böylece "rekabet edici (kompetitif) inhibisyona" neden olurlar. Rekabetçi olmayan baskılamalarda ise inhibitör, mikroorganizma ile substrat arasındaki ilişkiye bir etkide bulunmaz.

Diğer taraftan, gelişme için gerekli olmayan fakat gelişme hızını artıran maddelere de "aktivatör" denilmektedir. İnhibitör, gelişen bir mikroorganizmanın μ_{max} değerini azaltır ve K_s değerini artırır, aktivatör ise tersine μ_{max} değerini artırır, buna karşılık K_s değerini azaltır.

Deneysel sonuçlar, rekabetçi inhibitör bulunan besiyerindeki gelişme kinetiği için Monod denkleminin aşağıdaki şeklinin geçerli olabileceğini göstermektedir:

$\mu = (\mu_{max}\ S) / (\alpha K_s + S)$ 02.44

Buradaki α katsayısı mikroorganizmaya ve inhibitörün türü ile derişimine bağlı olup;

$\alpha = (1 + [I] / K_i$ 02.45

eşitliği ile belirlenmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi inhibitörsüz besiyerinde [I]= 0 olduğundan yukarıdaki eşitlik normal Monod bağıntısına dönüşecektir. Ayrıca K_i sabiti, çok büyük olan inhibitörler için ([I] / K_i) "1" yanında yok sayılabileceğinden yine aynı şekilde normal Monod bağıntısı geçerli olacaktır.

Rekabetçi inhibisyonlar için geçerli olan yukarıdaki bu eşitlik, K_s sabitinin α faktörüne bağlı olarak arttığını, fakat "μ_{max}" değerinin değişmediğini göstermektedir.

Rekabetçi olmayan baskılamalarda ise Monod bağıntısının aşağıdaki şekli geçerli olmaktadır:

$\mu = \mu_{max} S / \alpha(K_s + S)$ 02.46

Bu eşitlikten de anlaşılacağı gibi bu tür baskılamalarda inhibitör, mikroorganizmanın K_s değerini değiştirmeden maksimum özgül gelişme hızını (μ_{max}) azaltmaktadır. K_s'nin çok küçük olduğu durumlarda S'nin yanında yok sayılabileceğinden;

$\mu = \mu_{max} / \alpha$ 02.47

eşitliği geçerlilik kazanır.

02.06.07. Kompleks Ortamlarda Mikroorganizmaların Gelişmesi

Şekil 02.02'de görülen gelişme kurvesi, bir tek karbon ve enerji kaynağı ile belirli bir ortamda gelişen mikroorganizmalar için tipik bir gelişme modelidir. Çizelge 02.09'da *E. coli* için gösterildiği gibi mikroorganizmanın özgül gelişme hızı kullanılan karbon kaynağına sıkıca bağlıdır.

Çizelge 02.09. Farklı karbon kaynaklarında *E. coli* özgül gelişme hızı

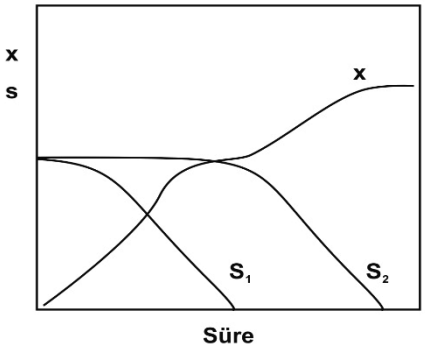
Karbon kaynağı	Özgül gelişme hızı (h^{-1})
Kompleks ortam + glikoz	1,20
Glikoz + mineral tuzlar	0,82
Asetat + mineral tuzlar	0,52
Süksinat + mineral tuzlar	0,14

Birden fazla karbon ve enerji kaynağı içeren ortamlardaki kesikli kültürlemede genellikle belli bir süre için karbon kaynaklarından yalnızca biri kullanılacaktır. Yaygın olarak bilinen bir örnek, mikroorganizmaların glikoz ve laktoz içeren bir ortamda geliştirilmeleridir.

Böyle bir ortamda gelişme ve substrat kullanımının kinetiği Şekil 02.13'te görülmektedir.

Bu tip iki gelişme fazına sahip davranış "diauxic" gelişme olarak isimlendirilir. Glikoz, çok kolay kullanılan bir karbon kaynağı olup öncelikli kullanılır ve daha sonraki laktoz kullanımı üzerinde katabolik baskıya sebep olur.

Eğer ortamdaki karbon substratlarının sayısı ikiden de fazla ise birbirini izleyen gelişme hızlarındaki azalma ile birlikte bir seri halinde gelişme fazları gözlenir.



Şekil 02.13. İki karbon ve enerji kaynağı içeren bir ortamda kesikli gelişme

Yalnızca çoklu karbon kaynağı değil, aynı zamanda peptonlar, aminoasitler, nükleotitler, vitaminler ve diğer metabolik ara ürünler gibi çeşitli bileşenler içeren kompleks bir ortamda hücreler, gelişmeleri sırasında birçok geçiş evreleri gösterirler. Hücreler önceden ilave edilen ara ürünlerin bulunduğu ortamlarda geliştirilirlerse bu bileşenleri katalize eden enzim sistemleri, bu bileşenler tamamen kullanılana kadar sentezlenmez. Bu nedenle gelişme kompleks ortamlarda gerçekleştirildiğinde hücre, ortamdaki yararlanabileceği ara ürünleri sırasıyla tüketilir ve zamanla daha fazla enzim sentezine gereksinme duyulur.

Böylece önceden oluşturulmuş ara ürünler ve kolay kullanılabilen besinler tüketilip gelişme hızı azalır. Böyle kompleks ortamlarda hücreler logaritmik çoğalma yerine zamanla tüketilen her bir besin için azalan bir eğim gösterirler ve gelişme kurveleri bir seri logaritmik kurvenin birleşmiş şeklidir. Bu gelişme kurvesi şekli, gelişme ve ürün oluşumu için çoğunlukla kompleks ortamlar kullanan endüstriyel fermantasyonlarda çok yaygındır.

Hatırlatma:

Her mikroorganizmanın belirli bir koşulda (örneğin sıcaklık) minimum, optimum ve maksimum gelişme parametresi, diğer tüm koşulların (örneğin pH, O/R potansiyeli, A_s, besin maddelerinin varlığı vb.) optimum olduğu koşulda ve çok genel olarak laboratuvar ortamında ölçülür ve bu şekilde bildirilir. Diğer parametrelerde sapma olduğunda doğal olarak ve özellikle minimum ve maksimum gelişme parametreleri değişir ve daha dar sınırlarda gerçekleşir. Buna göre gıdalardaki gerçek parametreler çok farklıdır. Bu durum, özelikle gıda güvenliği açısından önemlidir.

Salmonella örneğinde olduğu gibi serotip ve genel olarak suş farklılıkları da önemlidir.

Minimum ve maksimum dışındaki gelişme parametrelerinde zaman faktörü ihmal edilmemelidir.

03. MİKROORGANİZMA İNDİRGENMESİ

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN, Doç. Dr. Hilal HALKMAN

03.01. Genel Bilgiler **061**
03.02. Isıl İşlem **061**
03.03. Asitlendirme ve Kimyasal Koruyucular **065**
03.04. Işınlama **067**
03.05. Membran Filtrasyon **069**
03.06. Yüksek Basınç **070**
03.07. Biyolojik Kontrol **070**

03.01. Genel Bilgiler

Gıda sanayisindeki uygulamaların önemli bir kısmı, mikroorganizma indirgemesi üzerine kurulmuştur. Bitkisel yağlar gibi bazı gıda sanayilerinde mikroorganizma sorunu hiç olmaz çünkü bu ürünlerde su yoktur.

Ürünün çeşidi, uygulanacak indirgeme yönteminde çok önemli bir etkendir. Örneğin, hiçbir süt ürününe ışınlama uygulanamaz, kimyasal koruyucu her ürüne katılamaz. Membran filtrasyon, sadece membrandan geçebilecek sıvı ve gazlara uygulanabilir.

Soğutma, dondurma, kurutma ve modifiye gaz atmosferi/ vakum altında koruma uygulamalarında mikroorganizma indirgemesi olmaz. Bu gibi uygulamalarda mikroorganizma gelişmesi yavaşlar hatta durur. Dondurma uygulaması sırasında bir miktar indirgeme olur, ancak bu indirgeme önemsizdir. Dondurmanın amacı, mikroorganizma indirgemek değil, mikroorganizma gelişmesini durdurmaktır.

Yüksek basınçlı karbondioksit, yüksek gerilim darbeli elektrik alanı, salınımlı manyetik alan, ultrason, darbeli ışık, darbeli X ışını ve yüksek voltaj ark deşarjı gibi yeni mikrobiyel indirgeme sistemleri üzerinde laboratuvar düzeyinde çalışılmakta ve başarılı sonuçlar alınmaktadır, ancak henüz endüstriyel anlamda yaygın kullanım alanları yoktur.

Kitabın bu bölümünde ağırlıklı olarak sanayiye yönelik mikroorganizma indirgemesi anlatılmıştır. 05. Sterilizasyon bölümünde ise laboratuvar uygulamalarındaki sterilizasyon konuları ağırlıklıdır.

03.02. Isıl İşlem

Gıda sanayisinde mikroorganizma indirgemeye yönelik en yaygın uygulama, ısıl işlemdir. Tüm canlı hücrelerdeki proteinler yüksek sıcaklıklarda geriye dönüşsüz

olarak denatüre olurken yaşam için gerekli olan enzimler de inaktive olur. Bu, hücre için ölüm anlamına gelir.

Uygulanacak ısıl işlemin sıcaklık ve süresi pek çok faktöre bağlıdır. Öncelikle pastörize süt örneğinde olduğu gibi "amaç" önemlidir. Aşağıda, içme sütüne uygulanan ısıl işlem uygulaması anlatılmıştır.

Her şeyden önce, çiğ sütün yararlı bakteri kaynağı olması nedeniyle hiçbir ısıl işlem uygulanmadan tüketilme önerisi, tam bir bilgisizlik ve sorumsuzluktur. Çiğ sütte yararlı bakteriler vardır, ancak sayıları yok denecek kadar azdır ve sadece deneyimli laboratuvarlarda bu bakteriler izole edilip süt ürünleri sanayisinin kullanımına sunulur. Bir diğer deyiş ile çiğ süt yararlı bakteri kaynağı olarak gösterilemez. Ancak çiğ sütte patojenik *Salmonella* spp. ve *E. coli* O157:H7 gibi primer patojenlere rastlamak mümkündür.

Sütün pastörizasyonunda asıl hedef, sporsuz patojen bakterilerde tam indirgeme sağlanmasıdır. Ancak hedef, tüm patojenlerin imhası değildir. Örneğin spor formundaki *Clostridium botulinum*, *Cl. perfringens* ve *Bacillus cereus*, bu uygulamada dikkate alınmaz. Çünkü soğuk zincir ile korunan ve sadece raf ömrü uzatılan pastörize sütte standart raf ömrü içinde bu sporların çimlenerek sayılarını artırmaları ve hastalık oluşturacak sayıya erişmeleri beklenmemektedir.

Daha önce sütün pastörizasyonunda tüberküloz etmeni bakterinin imhası hedef alınırken bugün Q humması[1] etmeni olan *Coxiella burnetii* hedef alınmaktadır. Bu amaçla çiğ süt, 72 °C'ta 15 sn süre ile pastörize edilir[2]. Bu uygulama sırasında çiğ sütte bulunan enterik patojenler tümüyle imha olur ve devamında saprofit vejetatif bakteri hücreleri de büyük çoğunlukla ölür. Bu ısıl işleme dayanıklı olup canlı kalmış olan vejetatif hücreler, soğuk zincir altında olsa dahi yavaş bir gelişme gösterir. Ayrıca canlı kalmış olan bakteri sporları da çimlenerek gelişmelerine devam eder. Pastörize sütte canlı kalmış sporlu patojen bakteriler varsa bunlar çimlenerek hastalık yapacak sayıya çıkıncaya kadar süt zaten tüketilemez duruma gelecek kadar bozulmuş (ekşimiş) olur.

Görüldüğü gibi sütün pastörizasyonunda asıl hedef, sporsuz patojen bakterilerin indirgenmesi/ yok edilmesidir. Hammadde mikrobiyolojik olarak ne denli yüksek kalitede ise (düşük sayıda toplam bakteri içeriği), ısıl işlem normu ne kadar yüksek ise ve soğuk zincir ne denli korunursa ürünün raf ömrü o denli uzun olur (bknz⇒ 02. Mikroorganizma Gelişmesi ve 05. Sterilizasyon bölümleri).

---

[1] Q fever; Q humması ismi, Query= sorgulama kelimesi kökenlidir. Hastalığın 1935 yılında ilk olarak görüldüğü Avustralya/ Queensland eyaletinde bu hastalığa anlam verilememiş ve sorgulanması gerektiği için Query ile ifade edilmiştir. Kimi kaynaklar, Q harfini Queensland ile özdeşleştirir.

[2] Günümüzde havyan sağlığı ile çiğ sütün toplanması, soğutulması ve pastörize süt işleyen fabrikaya ulaştırılmasındaki aksamalar nedeni ile sütün pastörizasyon normu bu değerden (72 °C'ta 15 sn) çok daha yüksektir.

Süte uygulanan ikinci ısıl işlem şekli, UHT'dir. Genel uygulama şekli ile ~135 ºC'ta en az 3-5 sn ısıl işlem uygulaması ile çiğ sütte bulunan spor formundaki bakteriler de dâhil olmak üzere tüm mikroorganizmalar öldürülür.

İçme sütü ile ilgili olarak, "Uzatılmış Raf Ömrü (ESL= Extended Shelf Life)", üçüncü uygulamadır. Özellikle içme sütüne yönelik ısıl işlemlerde besin maddesi kaybı üzerinde gereksiz pek çok yayın/ tartışma olmakla birlikte UHT süt için duyusal nitelik kaybı, ekonomik açıdan daha fazla olumsuz tepkiler almaktadır. ESL uygulaması, UHT ısıl işlem normunun biraz altında ama her koşulda soğuk zincir ile ilişkilendirilmiş (entegre edilmiş) bir ısıl işlemdir. Duyusal kalite, UHT süte göre çok daha fazla korunmuştur (bknz ⇒ 01.05. Sporlanma ve Germinasyon bölümü/ Raf Ömrü Uzatılmış Süt paragrafı).

Süte uygulanan bir diğer ısıl işlem şekli, ambalajı ile birlikte sterilizasyondur. Bu amaçla süt, özel hermetik ambalajı içinde 115 ºC'ta 13 dk ya da 121 ºC'ta 3 dk ısıl işlem uygulanarak sterilize edilmektedir.

Çoğu ulusal/ uluslararası standartlarda UHT süte steril değil, "uzun ömürlü süt" adı verilmektedir. Pratik uygulamada hammadde olan çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesinden endişe ediliyorsa ısıl işlemde 135 ºC'tan birkaç ºC daha fazla ve 5 sn'den daha fazla süre uygulanmaktadır. UHT sütün steril değil de "uzun ömürlü süt" olarak tanımlanmasındaki temel neden, bezelye konservesi örneği ile açıklanabilir. *Cl. botulinum* tehlikesine karşı 1920'li yılların başında süt gibi nötr pH'lı olan bezelye konservesinde tüm ölüm kinetikleri hesaplanmış ve devamında *Cl. botulinum* dışında ısıl işleme daha fazla dirençli olan sporlu bakterilerin de ölüm kinetikleri belirlenmiştir. Buna göre, teneke kutuda 1 kg bezelye konservesi otoklavda 121,1 ºC (= 250 ºF) sıcaklıkta 15 dk tutulursa sterilizasyon ve mikrobiyolojik olarak tam kalite güvencesi sağlanmış olur. Bu uygulamada indirgenmesi hedeflenen bakterinin *Cl. botulinum* değil ısıl işleme çok daha dirençli sporlu çürükçül bakteriler olduğuna dikkat çekilmektedir.

Uygulanan ısıl işlem normunun sütte sterilizasyon anlamına gelip gelmediği temel gıda güvenliği yaklaşımında önemli değildir, patojen sorunu yoktur, gerisi süt işleyen fabrikaların duyusal kalite ve ekonomik anlamda risk alıp almamasına bırakılmıştır.

Bir diğer yaklaşımla, toprak kökenli bir patojen olan *Cl. botulinum* sporları, rüzgâr ve toz aracılığı ile süte bulaşırsa süt soğutulmuş olacağı için sporlar çimlenmeden ısıl işleme maruz kalsa bile aşağıda açıklandığı şekli ile 121,1 ºC'ta 3 dk ısıl işlem, "en düşük botulinum pişirmesi" çerçevesinde bu sporlarda 12D indirgeme sağlayacaktır. Dolayısı ile UHT sütte *Cl. botulinum* tehlikesi kalmayacaktır. Bu uygulamada sporlu patojenler olan *Cl. perfringens* ve *B. cereus* sporları da tümüyle öleceği için gıda patojenleri açısından sorun kalmaz.

UHT uygulanmış içme sütü, pastörize içme sütünden farklı olarak oda sıcaklığında 4-9 ay depolanır. Depolama ömrünü belirleyen faktör, mikrobiyolojik değildir. *B. cereus* ve *Pseudomonas* spp. gibi psikrofil/ psikrotrof bakteriler,

sağımdan ısıl işleme kadar olan süre içinde, süte proteolitik enzimler salgılar. UHT uygulaması sırasında, spor formunda olsalar da mikroorganizmalar tümüyle imha olur, ancak bunların daha önce salgılamış oldukları proteaz enzimleri tam olarak etkisizleştirilemez (inaktive edilemez). Devamında basit biyokimyasal tepkimeler çerçevesinde UHT sütte bozulma/ kesilme görülür. Ürün steril olmakla birlikte tüketici tarafından kabul edilemez duruma gelir. UHT içme sütü üreten firmalar, bu nedenle son kullanma tarihini 4-9 ay gibi geniş bir sınır içinde tutarlar.

Düşük asitli sebze konservelerine örnek olarak nötr pH'lı bezelye konservesi üretiminde standart olarak 121 °C'ta 15 dk ısıl işlem uygulanır. Bu norm, *Cl. botulinum* için hesaplanmış değildir. *Cl. botulinum* için nötr pH'da D_{121}= 0,21 dk olup 15 dk sürede 71 D'lik indirgeme anlamına gelir. *Cl. botulinum* için 1922 yılında nötr pH'lı ortamda termal ölüm süresi 250 °F'ta (121,1 °C) 2,78 dk olarak hesaplanmış, 1938 yılında 2,45 dk şeklinde düzeltilmiş, ancak daha sonra güvenlik açısından 3 dk olarak benimsenmiştir. 2,45 dk uygulamada *Cl. botulinum* için 12D indirgeme sağlanır. 121,1 °C'ta 2,45 ya da pratik uygulanışı ile 3 dk ısıl işlem, "en düşük botulinum pişirmesi= minimum botulinum cook" olarak anılır.

Bazı yerli ve yabancı bilimsel kaynaklarda, en küçük bakteri (spor) hacminin 10^{-12} cm^3 olduğu, dolayısı ile 1 cm^3 hacim içine 10^{12} adet bakteri (spor) sığabileceği ve buna bağlı olarak 12D şeklinde uygulanacak ısıl işlem ile tümünün öldürüleceği ifade edilir. Bu, tümüyle yanlış bir bilgilendirmedir ve konu ile ilgili hiçbir bilimsel temele dayalı değildir.

Oysa başka bilimsel kaynaklarda sıklıkla 12 logaritma birimi (12D) indirgeme kavramı için 1 kg konserve kutusunda ısıya en dirençli spor sayısının 10^6 KOB/kutu (= 1000 KOB/g) olması halinde ısıl işlem sonunda her kutuda 10^{-6} canlı spor kalacağı, bunun da teorik olarak her 10^6 kutunun 1 adedinde 1 canlı spor kalabileceği şeklinde açıklama vardır ve doğru olan tanımlama da budur (bknz ⇒ 05.09. D, z ve F Değerleri bölümü).

Isıl işlemde kullanılan bir başka tanım, özellikle asitli gıdalar için uygulanan ticari sterilizasyondur. Bu uygulamada, gıdanın daha yüksek asitlik miktarına bağlı olarak daha düşük ısıl işlem normu kullanılır. Sporlu olanlar dâhil olmak üzere patojenlerin tümü ile bozulmaya neden olan saprofitlerin çok büyük bir çoğunluğu ısıl işlem ile öldürülür. Isıya dirençli saprofit bakteri sporlarının bir kısmı canlı kalabilir. Ancak bunlar, gıdanın raf ömrü süresi içinde yüksek asitlik nedeni ile çimlenerek bozulma yapamazlar. Benzer durum, reçel gibi şekerli ürünler için de geçerlidir.

Standart mikrobiyolojik analizler sırasında, asitlik ve ozmotik basınç vb. baskılamalar ortadan kalktığı için katı besiyerinde bu sporlar çimlenerek koloni oluştururlar. Ancak bu kolonilerin görülmesi gıdanın tehlike içerdiği ve/veya bozulacağı anlamına gelmez. Örneğin, salça gibi düşük pH'lı bir gıdanın toplam sporlu bakteri analizinde birkaç bakteri kolonisi görülmesi, asidotolerant

bakteriler açısından bir bozulma tehlikesi gösterir. Bu tehlikenin belirlenmesi için plate count agar gibi genel bir katı besiyerinin pH'sı, analiz edilen numunenin pH'sına getirilerek aynı analiz tekrarlanır. pH'sı düşürülmüş genel katı besiyerinde yapılan toplam sporlu bakteri analizinde inkübasyon sonrası koloni görülürse ürünün bozulma olasılığı yüksektir. Koloni görülmezse gıdanın asitliği, canlı kalmış sporların çimlenmesini baskılamıştır ve dolayısıyla ürünün bozulma tehlikesi zayıftır. Bununla beraber, eğer ürünün raf ömrü uzun ise zamanla sporların çimlenmesi ve vejetatif hücrelerin yavaş yavaş çoğalarak ürünü bozma riski her zaman vardır. Bunun kontrolü ise genel katı besiyeri pH'sının ürün pH'sından 0,1-0,2 birim yukarıya ayarlanması ile yapılır. Bu koşulda koloni gelişmesi görülürse uzun süreli depolamada ürünün bozulma tehlikesi vardır.

Buna karşın, salça numunesinde laktobasile rastlanmış ise ısıl işlem sonrası bulaşma anlamına gelir. Ürün kısa bir süre içinde bozulacaktır ve işletmede acil düzeltici uygulama başlatılmalıdır.

Gıdaların ısıl işlem ile korunmasında gıdanın asitliği en önemli faktördür. Gıdalar basitçe, düşük asitli ve yüksek asitli olarak 2 grupta toplanır ve buradaki sınır, basit olarak domatesin asitliği ile tanımlanan pH 4,5'tir. Buna göre, pH 4,5 üzeri olan gıdalar düşük asitli, pH 4,5 ve altı olan gıdalar yüksek asit olarak tanımlanır. Kimi kaynaklar bu sınır değeri pH 4,6 ya da 4,4 olarak da vermektedir.

Buradaki sınırın çok kesin olmadığı açıktır ve bu konu 12. Gıda Güvenliği bölümünde ayrıntılı olarak verilmiştir.

03.03. Asitlendirme ve Kimyasal Koruyucular

Sofra tuzu ve şeker dâhil olmak üzere her kimyasal madde, yüksek derişimlerde gelişmeyi engelleyici ve daha da yüksek derişimlerde öldürücü etki yapar. Buna bağlı olarak hiçbir kimyasal madde, bakteriyostatik (bakteri gelişimini durdurucu) ya da bakterisit (bakteri öldürücü) vb. şekilde sınıflandırılamaz. Aynı kimyasal madde, derişime bağlı olarak bakteriyostatik ya da bakterisit etki yapar.

Turşu örneğinde olduğu gibi, gıdaların asitlendirilerek korunması, insanlık tarihinde bilinen en eski uygulamalardan birisidir. Turşu, sadece asitlik ile değil beraberinde tuz ile de sebzeleri koruma yöntemidir. Bir yaklaşıma göre sucuk ve yoğurt yapmak, eti ve sütü asitlendirerek korumaktır. Arkeolojik verilere göre 6000 yıldan bu yana yapılan peynir ise sütü başka bir koruma şeklidir, ancak asitlik yanında kurumadde ve tuz da etkilidir. Özellikle çiğ yenilen geniş yapraklı salataların sirke ile yıkanması, patojenler için etkili gibi görülse de patojenlerin giderek aside direnç kazanmaları da söz konusudur.

Reçel de bilinen en eski gıda koruma yöntemlerinden birisidir. Et, süt ve sebzelere kıyasla çok daha asitli olan meyvelere şeker ilavesi ile oluşturulan yüksek ozmotik basınç, genel olarak gıdanın bulunduğu ortamı mikroorganizma gelişmesi için olumsuz hale getirir. Hafif bir ısıl işlem ile sporsuz primer patojenler tümüyle öldürülür. Patojenler de dâhil olmak üzere canlı kalmış bakteri

sporlarının yüksek asitlik ve yüksek ozmotik basınç varlığında çimlenerek sorun yapması beklenmez.

Lakerda, salamura yaprak ve siyah zeytin, sadece tuz ile geleneksel olarak korunan gıdalara örnektir. Yeşil zeytin ise asitlendirme ve tuz ile korunur.

Gıda sanayisinde sorbik asit ve benzoik asit tuzları, izin verilen gıdalarda belirli derişimlerde kullanılmaktadır. Devamında klor, klor dioksit, ozon, H_2O_2 vb. kimyasallar da gıdalardaki mikroorganizma yükünü indirgemek için kullanılmaktadır.

Gelişmiş ve gelişmekte olan tüm toplumlarda organik gıdalara karşı talep artarken özellikle kimyasal koyuculara karşı tepki de artmaktadır. Kuşkusuz, gıdalarda kimyasal koruyucuların savunulması, hiç kimse tarafından benimsenmez. Bununla beraber, 2011 yılının mayıs ayında Almanya çıkışlı *E. coli* O104:H4 salgını da göz ardı edilemez (bknz ⇒ 09.10. Enteropatojenik *E. coli* Serotipleri ve 12. Gıda Güvenliği Bölümleri). Bu salgın, Almanların klor vb. kimyasal maddeleri kullanmak istemedikleri için büyümüştür.

Kimyasal koruyucular konusunda 3 kavramın hatırlanması gereklidir: GRAS, NOAEL ve ADI.

GRAS (Generally Recognized As Safe; Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen): Bu grup kimyasalların/ gıda katkılarının insan sağlığına zararlı olmadığı kabul edilmektedir. Uluslararası düzeyde kabul gören FDA ve EFSA gibi örgütler, bu katkılar ile ilgili listeler yayımlamaktadır[3]. Buna göre, bu grup kimyasalların gıda koruyucusu olarak kullanılmasında sınır yoktur. Ancak her gün 2 L süt ve süt ürünü eşdeğeri[4] tüketilmesinin dahi insan sağlığına olumsuz etki yaptığı bilinmektedir.

NOAEL (No Observed Adverse Effect Level; Olumsuz Etkinin Gözlenmediği Derişim): Deney hayvanlarında mg/kg vücut ağırlığı olarak yapılan toksisite testlerinde sağlık ile ilgili kayıtlara göre herhangi bir olumsuz etkinin bu tarihe kadar belirlenmediği gıda katkısı derişimi (bknz.⇒ 12 Gıda Güvenliği bölümü).

ADI (Acceptable Daily Intake; Günlük Kabul Edilebilir Tüketim Miktarı): Gıda katkıları/ kimyasal gıda koruyucuları için en yaygın kullanılan kavramdır. Bazı uluslararası gıda kuruluşları tarafından bu değer NOAEL/100 olarak kabul edilir. Bir diğer deyiş ile bu yaklaşım, çok yüksek bir gıda güvenliği standardıdır. NOAEL değerinin yüze bölünme nedeni; x10= insan ile deney hayvanı farkı, diğer x10 ise toplumda aşırı duyarlı bireylerin bulunma olasılığıdır. ADI değeri, mg/kg insan vücut ağırlığı olarak tanımlanır. Kimi kaynaklar, ADI hesaplanırken

[3] Bknz: Google ve diğer arama motorları taraması; FDA+GRAS ve EFSA+GRAS sorgulaması. İnternetteki bilgi kirliliğine dikkat edilmelidir.

[4] Endüstriyel ölçekte olmak kaydı ile çok yaklaşık olarak 1 L sütten 150 g Beyaz peynir ya da 1 L ayran veya 900 g yoğurt elde edilir.

NOAEL değerinin en az yüze bölünmesi gerektiğini bildirmektedir. ADI= NOAEL/200 de kullanılmaktadır.

Gıda koruyucusu olarak kullanılan pek çok kimyasal vardır. Bunların etki mekanizmalarının açıklanması, bu kitap kapsamı dışındadır. Nisin örneğinde olduğu gibi genel olarak bakteriyosinler de bu kitap kapsamı içinde ele alınamayacak kadar geniş bir konudur ve üzerinde çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Çok muhtemelen gelecekte gıdaların mikroorganizma kaynaklı hastalıklardan korunması ve bozulmaların önlenmesi için GRAS olarak kullanılacak yeni gıda katkıları bulunacaktır.

03.04. Işınlama

Wilhelm Conrad Röntgen'in (1845-1923) X (Röntgen) ışınları ve Marie Curie'nin (1867-1934) radyasyon üzerindeki çalışmalarına paralel olarak gıdaların ışınlanarak korunması üzerinde ilk patent 1905 yılında alınmıştır. Basit tarifi ile DNA'daki kırılma/ kopma nedeni ile organizma hasar görür/ ölür. Gıda ışınlama, sadece mikroorganizma öldürmeye yönelik bir uygulama değildir. Örneğin, baklagillerde böceklenme kontrolü yanında patates ve soğanda filizlenmenin önlenmesi için düşük dozda ışınlama uygulamaları da yaygın olarak kullanılmaktadır.

Işınlama, iyonlaştırıcı olan radyasyon ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak iki grupta incelenir. Bunlar X (iks) ve γ (gama) ışınları gibi yaydığı enerji 30-34 eV'dan daha yüksek olan iyonlaştırıcı radyasyon ve UV ışınları gibi yaydığı enerji 30-34 eV'dan daha düşük olan iyonlaştırıcı olmayan radyasyondur. X ve γ ışınları penetrasyon gücüne sahiptir. Işınlanacak olan materyalden geçerek yoluna devam ederler. UV ışınlarının penetrasyon gücü yoktur, dolayısı ile hava, ambalaj materyali ve içme suyu gibi berrak sıvıların ışınlanmasında kullanılır.

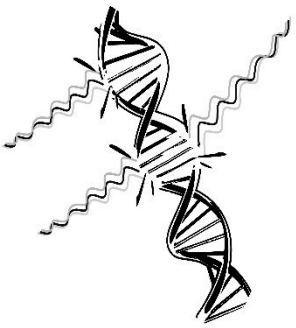
Penetrasyon, dalga boyu ile de ilgilidir. X ışınlarının dalga boyu 10 nm'den (100 °A) daha kısadır. Gama ışınlarının dalga boyu ise 0,1 nm'den (1 °A) daha kısadır ve ^{60}Co ile ^{137}Cs kaynaklarından elde edilir. UV ışınları, geniş bir spektrumdur (100-400 nm). Öldürücü etkinin en yüksek olduğu dalga boyu 253,7 nm'dir ve UVC olarak tanımlanır. MUG reaksiyonu için ~366 nm uzun dalga boyu gerekir.

Gıda ışınlamada doğrudan (direkt) ve dolaylı (indirekt) etki vardır. Temel etki, DNA'nın ışın ile kırılmasıdır (doğrudan etki). DNA tek ya da çift iplikçikten kırılabilir (şekil 03.01). Çift iplikçik kırılması, daha fazla öldürücüdür.

Dolaylı (indirekt) etki farklıdır ve gıda ışınlama uygulamalarında prensip olarak benimsenmez, ancak bu dolaylı etkinin mikroorganizma indirgenmesindeki etkisi de inkâr edilemez. Işınlar sadece DNA'yı değil, başka molekülleri de parçalar ve serbest radikaller oluşur. Bir seri biyokimyasal tepkime sonunda su molekülünden oluşabilen H_2O_2, hücre için öldürücüdür ve bu dolaylı etkidir.

Mikroorganizma, DNA kırılmasını onarabilir. Onarma mekanizmasına sahip olanlar, ışınlamaya dirençli olarak tanımlanır (*Deionococcus radiodurans*). Işınlamada önemli olan, DNA'daki hasardır.

Işınlama sonrası gıdada kalabilen gerek H_2O_2 gerek diğer serbest radikaller ya da serbest radikallerin başka moleküllere bağlanması ile oluşan yeni moleküllerin kanser yapabilme (karsinojen) tehlikesi vardır. H_2O_2 ile serbest radikallerin oluşması ve bunların bağlandığı yeni moleküller, asıl olarak su içeriği yüksek gıdalarda ve doğrudan su moleküllerinden oluşur. Buna bağlı olarak, baharat gibi su içeriği düşük gıdalarda serbest radikal oluşması söz konusu olmaz. Tüm kırmızı etler, kümes hayvanları etleri ve her türlü su ürünü, dondurulduktan sonra ışınlanırsa serbest radikal oluşmaz.



Şekil 03.01. DNA'nın ışın ile kırılması

Gıda ışınlamada yaygın olarak UV ve gama ışınları kullanılır. Ambalaj materyali gibi düzgün yüzeyler, içme suyu, peynir olgunlaştırma odaları, elma şarabı vb. ortamlarda mikroorganizma indirgenmesi için UVC uygulaması başarı ile kullanılmaktadır. UV lambası materyale ne kadar yakın ise etki o denli artar (temel fizik kurallarına göre aydınlanma, uzaklığın karesi ile ters orantılıdır).

Işınlamada doz kGy (kiloGrey) ile ifade edilir. 1 kGy, 1 kg materyalin 1000 joule iyonize radyasyon absorblamasıdır (soğurmasıdır).

Işın kaynaklarının güçleri farklıdır ve dolayısı ile aynı etkinin sağlanması (enerjinin soğrulması) için farklı süreler gerekir. D_{10} değeri de buna bağlı olarak, ısıl işlemden farklı şekilde sadece D ile ifade edilir. Örneğin *E. coli* O157:H7 için çiğ kıymada D= 0,3 kGy ifadesi, ışın kaynağından bağımsız olarak çiğ kıymanın 0,3 kGy ışın alması (absorblaması) durumunda canlılıkta 1 log azalma olacağı anlamındadır.

Gıda güvenliği ve/veya standartlara uyum açısından yeterli bir indirgeme sağlanması amacıyla *E. coli* O157:H7 için hamburgerlerin 3 kGy ve baharatta *Bacillus cereus* için 10 kGy ışınlama gerekir. Bakliyatta böcek kontrolü için 1 kGy ve patateste filizlenmeyi önlemek için sadece 0,2 kGy yeterlidir. AIDS hastaları ve astronotlar için 40 kGy ışınlanmış gıdalar önerilmektedir.

Işınlama uygulamasında canlı hücre, fiziksel olarak ne kadar küçükse DNA'nın hasar görme olasılığı o denli azalır. Bu durum basit olarak ışının DNA'ya tesadüf etmesi ile ilgilidir. Dolayısıyla mikroorganizmalar içinde ışınlamadan en az etkilenenlerin virüsler olduğu çok açık olarak ortaya çıkar. Bu fiziksel küçüklük konusu, hiçbir şekilde ışınlamaya direnç olarak algılanmamalıdır. Hücrenin temel

genetik materyalindeki hasar dışında sitoplazma bileşenlerinde de ışınlama ile pek çok hasar oluşabilir.

Buna göre, mikroorganizma sporlarının ısıl işleme, kimyasal uygulamalarına ve ışınlamaya olan direnci, vejetatif hücreye göre daha yüksektir. Sporlar, vejetatif hücreye kıyasla ışınlama uygulamasından da daha az etkilenir. Bunun iki nedeni sporun fizik olarak vejetatif hücreden daha küçük olmasına bağlı olarak ışının DNA'ya tesadüf etme olasılığının daha az olması ve spor içinde suyun vejetatif hücreye kıyasla çok daha az olmasına bağlı olarak H_2O_2 oluşmasının nerede ise yok denecek kadar az geçekleşmesidir.

Gıda ışınlama; ısıl işlem, kimyasal koruyucu uygulaması, membran filtrasyon ve yüksek basınç uygulaması gibi bir mikroorganizma indirgeme yöntemidir. Öncelikli hedef, gıda güvenliğidir. Her gıda ışınlanmaz, ışınlanmasına gerek yoktur. Amaca göre farklı dozda ışınlama yapılır. Tüketici beğenisi de önemlidir, yüksek yağlı ürünler ışınlandığında tatta istenmeyen değişmeler olabilir. Bu kitabın basıldığı tarihte baharatta patojen bakteri indirgemesi için tüm dünyada uygulanan en geçerli yöntemlerden birisi ışınlamadır.

Ev tipi mikrodalga fırınların gıda ışınlama/ radyasyon ile hiçbir ilgisi yoktur. Endüstriyel amaçlı kullanılan mikrodalga fırınlara radyasyon etkisi kazandırılması için 1950'li yıllarda çok çalışılmış ancak başarılı olunamadığı için tümüyle vazgeçilmiştir.

Gıda ışınlamada absorblanan enerjinin gücüne bağlı olarak D değeri hesaplanabilir. Örneğin, çiğ kıymada *E. coli* O157:H7 için D= 0,3 kGy olarak saptanmıştır. Ancak ısıl işlemden farklı olarak z değeri olamaz çünkü absorblanan enerji, doğrudan enerji kaynağının gücüne bağlıdır. Isıl işlemde otoklavlama aşamasında amaca göre sıcaklık ve/veya süre artırılabilir ya da düşürülebilir, ancak ışınlamada ışın kaynağının gücü artırılamaz ya da düşürülemez. Bir diğer deyişle, örneğin 3 kGy ışınlamayı güçlü bir ışın kaynağı 15 dk'da ama zayıf bir ışın kaynağı 2 saatte verebilir. Önemli olan, gıda ya da tıbbi malzeme vb. materyalin 3 kGy ışınlanmış olmasıdır.

03.05. Membran Filtrasyon

Diğer indirgeme yöntemlerinden farklı olarak membran filtrasyon öldürücü değil, sadece fiziksel olarak arındırma işlemidir. Öldürücü olmadığı için membran filtrasyonda D_{10} ve dolayısı ile z değerinden bahsedilemez.

Latincede zar anlamına gelen membran, selüloz nitrat (selüloz ester) ya da karışık ester yapısında olabilir. Gözenek büyüklüğü por ile ifade edilir ve birimi µm'dir. Membranın yapısı, düzgün borucuklar gibi değil, yün yumağı gibidir. Por, bu yapı içindeki en dar bölgenin çapıdır. Dolayısı ile ve basit olarak 0,45 µm porlu filtre denildiğinde çapı bu büyüklükten daha fazla olan hacimlerin bu filtrenin altına geçemeyeceği anlaşılır.

Membran filtrasyon sistemlerinin gıda sanayisindeki en yaygın kullanım alanı, içme suyu tesisleridir. Su fabrikalarında doğal kaynak suyu, bir seri işlemden sonra dolum öncesi mikrobiyolojik açıdan güvenli hale getirilmek için membran filtrasyon sistemlerinden geçirilir. Çalışma atmosferinde mikroorganizma bulunmaması gereken starter kültür hazırlama odaları gibi arındırılmış alanlarda da başarıyla kullanılır. Gıda sanayisi dışında ilaç ve eczacılık uygulamalarında da çok yoğun şekilde membran filtrasyon kullanımı vardır. Bu gibi uygulamalarda ortam havası ve membran filtreden geçirilebilecek sıvılar, mikroorganizmalardan tümüyle arındırılır.

Membran filtrasyonun gıda sanayisinde bir diğer kullanım alanı laboratuvar analizleridir. Başta içme ve kullanma suyu, gazlı meşrubat vb. pek çok gıdanın analizinde membran filtrasyon kullanılır (bknz ⇒ 05.04. Membran Filtrasyon).

03.06. Yüksek Basınç

Yüksek basıncın mikroorganizmalar üzerindeki inaktivasyon etkisi, 1914 yılında kanıtlanmış olmakla birlikte endüstriyel uygulamanın başlaması oldukça yenidir. Basit olarak, gıda üzerine 100-1000 MPa[5] basınç uygulanır. Uygulama süresi materyale ve indirgenmesi hedeflenen mikroorganizma türüne ve sayısına göre değişir. Sıcaklık 0-100 ^{o}C arasında olabilir. Baharat gibi kuru gıdalara değil et ve salam gibi et ürünleri, su ürünleri, meyve ve meyve suyu, jöleler, reçel ve marmelatlar gibi su içeriği yüksek gıdalara uygulanabilmektedir. Bu teknolojinin en büyük özelliği, gıdanın duyusal özelliklerinde ve besin içeriğinde kayıp oluşturmamasıdır. Sterilizasyon değil, bir anlamda gıdanın raf ömrünü uzatmaya yönelik bir uygulamadır.

03.07. Biyolojik Kontrol

Patojenlere karşı mücadelede bakteriyofaj kullanımı giderek daha fazla araştırılmaktadır. *Listeria monocytogenes* üzerindeki çalışmalar sonuç vermiş ve ticari faj preparatları piyasaya sürülmüştür. *Bdellovibrio bacteriovorus* ile yapılan çalışmalarda, antibiyotik dirençli *Salmonella* spp. ve *E. coli* O157 serotipi üzerinde olumlu sonuçlar alınmıştır.

Biyolojik kontrol yöntemlerinin ileride patojen indirgemesinde çok daha etkili olacağı beklenmektedir.

[5] MPa (Mega Pascal) basınç birimidir. 1 Mpa≅ 10 kg/cm^2

04. BESİYERLERİ[1]

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN, Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

04.01. Genel Bilgiler **072**
04.02. Kısa Tarihçe **072**
04.03. Besiyeri Hazırlama Şekilleri **075**
04.03.01. Formülden Hazırlama 076
04.03.02. Dehidre Besiyerlerinden Hazırlama 077
04.03.03. Kullanıma Hazır Besiyerleri 077
04.03.04. Bazı Özel Uygulamalar 078
04.04. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler **081**
04.04.01. Su 081
04.04.02. Peptonlar 082
04.04.03. Maya Ekstraktı 084
04.04.04. Et Ekstraktı 084
04.04.05. Malt Ekstraktı 084
04.04.06. Beyin ve Kalp Ekstraktı 084
04.04.07. Agar 085
04.04.08. Karbohidratlar 086
04.04.09. Tuz 087
04.04.10. Tampon Maddeler 087
04.04.11. pH İndikatörleri 088
04.04.12. Redoks İndikatörleri 089
04.04.13. Diğer İndikatörler 090
04.04.14. İnhibitörler (Baskılayıcılar) 091
04.04.15. Diğer Maddeler 092
04.05. Besiyeri Çeşitleri **093**
04.05.01. Genel Besiyerleri 094
04.05.02. Selektif Besiyerleri 095
04.05.03. Diferansiyel (Ayırt Edici; Fark Ettirici) Besiyerleri 097
04.05.04. Zenginleştirme Besiyerleri 098
04.05.05. İdentifikasyon Besiyerleri 099
04.05.06. Membran Filtrasyon Besiyerleri 099
04.05.07. Kombine Besiyerleri 100
04.05.08. Diğer Besiyerleri 100
04.06. Besiyerlerinin Hazırlanması **101**
04.06.01. Cam Malzeme 103
04.06.02. Tartım ve Eritme 104

[1] 04.01-04.11. bölümler, Prof. Dr. A. Kadir Halkman tarafından Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda verilen "Mikrobiyolojide Kullanılan Besiyerleri", 04.12. bölüm ise Prof. Dr. Filiz Özçelik tarafından aynı anabilim dalında verilen "Fermantasyon Kinetiği" adlı yüksek lisans ders notlarından özetlenmiştir.

04.06.03. pH Ayarlama 107
04.06.04. Katkıların İlavesi 108
04.06.05. Petri Kutularına Döküm 110
04.06.06. Kurutma 111
04.06.07. Yeniden Eritme 112
04.07. Depolama 113
04.07.01. Dehidre Besiyerlerinin Depolanması 113
04.07.02. Çözeltilerin Depolanması 115
04.07.03. Katkıların Depolanması 115
04.07.04. Hazırlanmış Besiyerlerinin Depolanması 116
04.08. Çözeltilerin Hazırlanması 118
04.09. Besiyeri Kalite Kontrolü 120
04.10. Besiyeri Hataları 120
04.11. Tehlikeli Maddeler 122
04.12. Substrat Formülasyonu 124
04.12.01. Substrat İçinde Bulunan Temel Bileşenler 125
04.12.02. Hücre Bileşimi 127
04.12.03. Özel Biyokimyasal Gereksinimler 128
04.12.04. Enerji Gereksinimleri 128
04.12.05. Endüstriyel Substrat Seçimi ve Formülasyondaki Genel İlkeler 129

04.01. Genel Bilgiler

Besiyerleri (besi ortamı, ortam, vasat, kültür ortamı, kültür vasatı, kültür besiyeri), mikroorganizmaların geliştirilmesi için formülize edilmiş ortamlardır. Bunlar, mikroorganizmaların geliştirilmesi, izolasyonu, identifikasyonu (tanımlanması), sayımı, duyarlılık testleri, sterilite testleri, klinik örneklerin incelenmesi, gıda ve çevre kontrolleri, biyolojik ürünlerin elde edilmesi, antibiyotik ve vitamin analizleri, endüstriyel analizlerin yapılması vb. gibi çok farklı amaçlara yönelik olabilir.

Besiyerleri çok farklı şekillerde hazırlanabilir ve kullanılabilir. Örneğin, süt bir "genel besiyeri" olup mikroorganizmaların gelişmeleri için gerekli bütün besin maddelerini ve bunların kullanılabilmesi için yeterli suyu içerir. Üzüm suyunda da gelişme için gereken besin maddeleri ve su bulunmasına karşın üzüm suyu yüksek asitliği nedeni ile sadece bu asitlikte gelişebilecek olan mikroorganizmaların (bazı bakteriler ve özellikle mayaların) gelişimine uygun bir ortamdır.

04.02. Kısa Tarihçe

Mikrobiyolojinin tarihçesinde kilometre taşı olarak anılan iki gelişme 1683 yılında Antoni van Leeuwenhoek'un mikroskobu icat etmesi ve bundan yaklaşık 2 yüzyıl sonra 1881 yılında Robert Koch'un jelatin kullanarak elde ettiği katı besiyerinden

Bacillus anthracis izole etmesidir. Böylece, hastalık etmeni olan pek çok bakteri izole edilebilmiş ve "Hasta bireyden muhtemel hastalık etmenini saf halde izole et. Bu etmeni sağlıklı bireye aşıla. Hastalık semptomlarının aynı olduğunu izle. Hastalandırılmış bireyden saf halde izole edeceğin etmenin ilk hasta bireyden izole ettiğin ile aynı olduğunu göster." şeklindeki Koch postulatı, giderek sistematik analiz yöntemi haline dönüşmüştür. Louis Pasteur tarafından 1882'de aşılamanın bulunması, 1928'de Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesi de mikrobiyoloji tarihinin önemli kilometre taşları arasındadır. Bu bölümdeki amaç, tüm mikrobiyoloji tarihini vermek değildir ve bu konu, kitabın kapsamı dışında kalır.

Aşağıda besiyerlerinin geliştirilmesi üzerine kısa bir kronoloji verilmiştir:

1819: Bartholomeo Bizio, ekmek üzerindeki kan gibi kırmızı renklenmelerin gerçekte ne olduğunu araştırmış, bunları mikroskop altında incelemiş ve mikroorganizmaları görmüştür. Kırmızı renkli sütlü ekmeği taze sütlü ekmeğe değdirerek *Serratia marcescens* olarak adlandırdığı bu mikroorganizmanın gelişmesini sağlamış ve renklenmenin insan eliyle yapıldığını kanıtlamıştır. Oysa daha öncesinde kırmızı benekli ekmeğe Hz. İsa'nın kanını içerdiği için kutsal gözü ile bakılıyordu.

1861: Louis Pasteur, mayaların oksijenli ve oksijensiz ortamda gelişimini inceleyip bunların geliştirilmesi için sıvı besiyeri formülünü açıklayan ilk bilim insanı olarak tarihe geçmiştir.

1869: Ferdinand Cohn, besiyeri bileşiminde mineral maddelerin önemini göstermiştir. Böylece farklı grup mikroorganizmalar ile çalışma olanağı doğmuştur.

1872: Alman botanikçi Oscar Brefeld, sıvı besiyerine jelatin ekleyerek elde ettiği katı besiyerinde tek spordan küf kolonilerini ürettiğini bildirmiştir.

1873: Edwin Klebs, "fraksiyon yöntemi" olarak adlandırdığı bir seyreltme tekniği kullanarak ayrı kültürler elde eden ilk bakteriyologlardan biridir. Bu yöntem basit olarak, sıvı ortamdan az miktarda numunenin başka bir besiyerine inokülasyonudur. Bu yöntemin dezavantajları, karışık kültürlerden sadece baskın türün izole edilebilmesi, çok fazla işgücü ve malzeme gerektirmesidir.

1877: John Tyndall, bugün Tindalizasyon olarak anılan ardışık ısıl işlem ile sterilizasyonu açıklamıştır.

1878: İlk saf kültür, "seyreltme tekniği" ile Joseph Lister tarafından elde edilmiştir. Lister, Pasteur'ün laktik fermentinden sütte ekşimeye yol açan *Bacterium lactis* adını verdiği bakteriyi izole etmiştir. Bir öze dolusu kesilmiş sütü kaynamış suya aktarmış, gerekli seyreltmeyi mikroskop kullanarak belirlemiş ve tek bakterinin olduğu seyreltiyi inokülasyon amacıyla kullanmıştır.

1880: İsviçreli bir botanikçi olan Karl Wilhelm von Nägeli, besiyeri hazırlamada pepton kullanımını öneren ilk bilim insanıdır.

1881: Robert Koch, aseptik olarak kesilmiş patates dilimlerinin katı besiyeri olarak kullanımındaki yetersizlik nedeniyle %10 jelatin eklenmiş sıvı besiyeri kullanarak saf *Bacillus anthracis* kültürünü elde etmiştir.

1882: Koch'un çalışma arkadaşları olan Walter Hesse ile eşi Fanny Eilshemius Hesse tarafından katılaştırıcı olarak agar önerilmesi ile sıvı besiyerinin katılaştırılmasında yeni bir dönem başlamıştır. Jelleştirici olarak agarın kullanılması mikrobiyoloji tarihine milat olarak geçer. Her ne kadar daha öncesinde jelatin bu amaçla kullanılıyorsa da jelatinin bazı mikroorganizmalar tarafından karbon kaynağı olarak kullanılması ve 35-37 ^{o}C'ta inkübasyonda sıvı hale geçmesinin getirdiği tüm olumsuzluklar agarın kullanılması ile ortadan kalkmıştır.

1883: Gayon ve Gabriel Dupetit, şekerler ve şeker alkoller gibi basit organik bileşiklerin kompleks organik bileşiklerin yerini alabileceğini göstermişlerdir.

1889: Limbourg, inhibitör olarak safra tuzlarını kullanmıştır. Safra tuzları (ox bile) günümüzde de koliform grup bakteriler için kullanılan besiyerlerinin çoğunda bulunmaktadır.

1891: Coprrado, safranın *B. mallei* gelişmesini teşvik ederken *B. anthracis* için bakterisit olduğunu ve *B. typhosus* ile *B. pneumoniae* üzerinde etkisi olmadığını gözlemiştir. Bu şekilde inhibitör kullanımı üzerinde yoğunlaşılmıştır.

1900: MacConkey ve Hill, safra tuzu glikoz brothu fekal kontaminasyon için basit bir test olarak önermişlerdir. Hemen arkasından MacConkey bu besiyerinde *B. enteritidis* geliştirmek için glikoz yerine laktoz kullanmıştır.

1902: Wilhelm von Drigalski ve Heinrich Conradi, *Salmonella* Typhi ile *E. coli* ayırt edilmesinde bu iki bakterinin şeker metabolizmasındaki farkını kullanmayı önermişlerdir. Böylece, selektif izolasyon kavramı daha da belirginleşmiştir.

1908: Christiaan Eijkman, sıcakkanlı hayvanların bağırsağından izole edilmiş koliform bakterilerin glikoz broth besiyerinde 46 °C'ta inkübe edildiğinde gaz ürettiğini göstermiştir. Bu test günümüzde de benzer bir şekilde kullanılmaktadır.

1908: Prof. R. Doerr, laboratuvarlar için Petri kutusuna nutrient agar dökerek hazırlanan besiyerini önermiştir.

1909: Prof. E. L. Marx, laboratuvar ölçeğinde dehidre nutrient broth, nutrient agar ve Endo agar formüllerine öncülük etmiştir.

1910: Amerikan Bakteriyologlar Derneği toplantısında W. D. Frost tarafından hazır besiyeri için benzer bir proses açıklanmıştır.

1910: İlk ticari besiyeri üretimi nutrient agar ve nutrient broth ile başlamıştır.

1916: Holt-Harris ve Teague, patojenik enterobakteri tanımlama ve izolasyonu için kullanılmak üzere eosin methylene blue lactose sucrose (EMB) agar besiyerini geliştirmişlerdir. EMB agar, günümüzde de kullanılan bir besiyeridir.

1950: Granül besiyeri üretimine başlanmıştır.

04.03. Besiyeri Hazırlama Şekilleri

Standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı, tipik bir ev mutfağına benzer. Besiyeri hazırlamak ise evde yemek yapmaktan çok farklı değildir. Mikrobiyolojik amaçla kullanılacak bir besiyerinin hazırlanması, çok basit olarak mutfakta çorba yapmaya benzetilebilir. Örneğin, domates çorbası yapmak için yemek kitaplarında miktarları verilerek tarif edildiği şekli ile önce un yağda kavrulur, üzerine domates suyu ya da domates püresi ile süt ve tuz ilave edilir, pişirilerek "çorba" hazırlanır. Ya da daha basit olarak, hazır toz haldeki domates çorbası belirli miktarda su ile pişirilir.

Benzer şekilde, besiyeri bileşimine giren maddeler ayrı ayrı tartılarak, ya da hazır dehidre besiyeri doğrudan tartılarak su içinde çözülür. En basit olarak nutrient brothun bileşimi, litrede 5 g pepton ve 3 g et ekstraktı şeklindedir.

Laboratuvarda pepton ve et ekstraktı varsa bunlar doğrudan tartılıp 1 L damıtık su içinde çözülür ve gerekli büyüklükteki cam kaplara dağıtılarak sterilize edilir. Laboratuvarda hazır dehidre nutrient broth varsa bundan 8 g tartılarak 1 L damıtık su içinde çözülür ve yukarıdaki işleme devam edilir.

Nutrient broth gibi basit bir besiyerine giren maddeler, çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında her zaman "el altında" bulunur. Dolayısı ile nutrient brothu bileşimden hazırlamak genellikle sorun değildir.

Ancak yabani maya izolasyonu ve sayımında kullanılan lysine medium besiyerinde 25 madde olduğu ve bunlar arasında 0,000001 g/L folik asit gibi zor bir tartımın da bulunduğu dikkate alındığında bu tip besiyerlerini standart bir mikrobiyoloji laboratuvarında bileşimden hazırlamanın zorluğu ve günlük uygulamada hiçbir şekilde pratik olmadığı ortaya çıkar.

Alicyclobacillus spp. aranmasında kullanılan BAT agar besiyerinin de standart bir laboratuvarda bileşimden hazırlanması oldukça güçtür.

Kuşkusuz, bileşimine 2 madde giren nutrient broth ile bileşimine 25 madde giren lysine medium besiyerleri uç noktalarda örneklendirilen besiyerleridir.

Besiyerinin bileşimi ister basit ister kompleks olsun, bileşimden hazırlamak yerine, dehidre hazır besiyeri kullanmanın üç önemli üstünlüğü vardır:

-Her maddeyi ayrı ayrı tartmak yerine hazır besiyerinden bir kez tartım yapmak çok daha kolay ve güvenilir bir uygulamadır.

-Özellikle miligram düzeyinde tartım yapılacak besiyeri bileşenlerinde hata yapma olasılığı vardır. Oysa bu maddeler, hazır dehidre besiyerleri içinde homojen şekilde dağıtılmış olmaları nedeniyle tartımlar çok daha güvenilir olur.

-Hazır besiyeri kullanmanın en önemli üstünlüğü hatta bir diğer deyiş ile zorunluluğu, bileşenlerin performansı ile ilgilidir. Ayrı ayrı tartılan bileşenlerden birisinin dahi özelliğini yitirmiş olması o madde ile hazırlanan besiyerinin

performansında kayda değer ölçüde kayba, hatta o besiyerinin tümüyle kullanılamaz hale gelmesine yol açar.

Besiyerlerinin bileşimine çok genel bir ortalama olarak 5-7 madde girer. Laboratuvarda bulunabilen bu bileşenlerin tümünün yeterli performans göstermesi beklenmemelidir. Özellikle organik bileşenlerin depolanma ömürleri, inorganik maddelere göre çok daha kısadır. Buna göre bileşenlerden birinin ya da bir kısmının performansında kayda değer düşme olmuş ise bu düşüş doğrudan besiyeri performansına yansıyacaktır.

04.03.01. Formülden Hazırlama

Yukarıda çeşitli örnekleri verildiği gibi besiyeri bileşenleri ayrı ayrı tartılarak besiyeri hazırlanabilir. Genel olarak önerilen bir yöntem olmamakla birlikte aşağıda verilen iki koşulda besiyerinin bileşim üzerinden hazırlanması bir anlamda zorunludur:

-Her besiyerinin ticari olarak pazarlanan dehidre hazır besiyeri formu yoktur. Özellikle yeni geliştirilen besiyerleri, güvenilirliklerini kanıtlayana ve/veya yeterli pazarlama potansiyeline ulaşıncaya kadar besiyeri üreticisi firmalar tarafından dehidre halde hazırlanmamaktadır.

-Özellikle çeşitli bilimsel araştırmalarda yeni ve modifiye besiyeri çalışmaları için bileşenlerin ayrı ayrı kullanılması gerekmektedir.

Besiyerinin bileşimden hazırlanması gerektiğinde bazen bileşime giren malzemelerin tümü, formülde verildiği şekli ile laboratuvarda bulunmayabilir.

Örneğin laktik asit bakterileri için kullanılan MRS agar besiyerinin formülünde $MgSO_4$ 0,2 g/L olarak verilmektedir. Laboratuvarın kimyasal madde deposunda $MgSO_4$ yok, ama bunun yerine $MgSO_4.6H_2O$ varsa molekül ağırlığı üzerinden hesaplanarak kullanılabilir.

Susuz $MgSO_4$'ın molekül ağırlığı Mg: 24, S: 32, O: 16 (4 atom oksijen olduğuna göre 4 x 16= 64) olmak üzere 120 mol gramdır. $MgSO_4.6H_2O$'da ise ilave 6 su molekülü olduğuna göre molekül ağırlığı 120 + 108= 228 mol gram olarak hesaplanır.

İkinci aşamada doğru orantı kurulur:

Mol ağırlığı 120 olan maddeden 0,20 gram gerekiyorsa
Mol ağırlığı 228 olan maddeden 0,38 gram gerekir.

Buna göre 0,2 g/L $MgSO_4$ yerine 0,38 g/L $MgSO_4.6H_2O$ kullanılması aynı anlama gelmektedir. Aradaki fark $MgSO_4.6H_2O$'da bulunan sudan kaynaklanmaktadır.

04.03.02. Dehidre Besiyerlerinden Hazırlama

Besiyeri üreticisi firmalar tarafından üretilmiş dehidre besiyerleri kullanımının tartışılmaz bir üstünlüğü vardır. Burada dikkat edilmesi gereken konu kalitedir. Pazarda düşük fiyatla satılan ve bu nedenle cazip gösterilen, ancak kayda değer düzeyde performans eksikliği olan markaların bulunduğu da dikkate alınmalıdır.

Dehidre formdaki besiyerlerinin kullanılması koşulunda üretici firma tarafından yapılan özel uyarılara dikkat edilmesi gerekir. Devamında aynı besiyeri için farklı üretici firmaların farklı uyarılarda bulunabileceği göz ardı edilmemelidir.

04.03.03. Kullanıma Hazır Besiyerleri

1950'li yıllardan bu yana bazı besiyeri üreticisi firmalar tarafından kullanıma hazır halde besiyerleri üretilmekte ve pazarlanmaktadır. Bunlar, vida kapaklı tüp ve şişelerde sıvı ve katı besiyerleri ile oldukça yaygın olarak Petri kutularındaki agarlı besiyerleridir. Genellikle plastik Petri kutularında hazırlanan agarlı besiyerleri sadece tek çeşit besiyerini içerebileceği gibi iki ya da üçe bölünmüş kutularda farklı besiyerleri de bulunabilmektedir. Bunlar içinde en yaygın kullanılanlardan birisi kanlı (blood) agardır. Bu besiyerinin neden hazır halde sağlanması gerektiği ve bu uygulamanın neden daha ucuz olduğu 06.08. Stok Takibi ve Analiz Ekonomisi bölümünde anlatılmıştır.

Yüzey kontaminasyonlarının belirlenmesi ve/veya kültürlerin taşınmasında kullanılan agarlı hazır besiyerleri de bulunmaktadır. Bunların iki farklı yüzünde iki farklı besiyeri bulunan tipleri aynı numunede örneğin hem toplam bakteri hem de koliform grup bakteri analizine olanak sağlamaktadır. Bunların bir yüzü maya-küf, diğer yüzü toplam bakteri vb. çeşitleri de vardır. Bu tip besiyerlerini kullanmak, işletme laboratuvarında büyük kolaylık sağlamaktadır.

Mikrobiyolojide başta sayım ve var/yok testleri olmak üzere çeşitli amaçlarla membran filtreler kullanılmaktadır. Örneğin içme ve kullanma sularında *E. coli* aranması ya da sayılması için en yaygın uygulamalardan biri, su örneğinin membran filtreden geçirilip bu filtrenin uygun bir katı besiyerine yerleştirilerek inkübasyona bırakılmasıdır. Burada amaca uygun bir şekilde hazırlanmış ve Petri kutusuna dökülmüş bir katı besiyeri kullanılabileceği gibi bu amaçla hazırlanmış özel besiyerleri de kullanılabilir. Bu tip besiyerleri, uygun bir pede (özel bir karton) emdirilmiş, kurutulmuş ve plastik bir Petri kutusu içine yerleştirilerek sterilize edilmiş şekilde pazarlanmaktadır. Kullanıcı için yapılacak tek işlem, pedi steril su ile ıslatmak ve filtreyi bu pede yerleştirerek inkübasyona bırakmaktır. Bir başka membran filtrasyon besiyeri grubunda ise steril plastik Petri kutusu içinde boş ve steril ped vardır. Kullanıcı, steril plastik tüplerde hazır olarak pazarlanan sıvı besiyerini pede ilave ederek besiyerini kullanıma hazır hâle getirir.

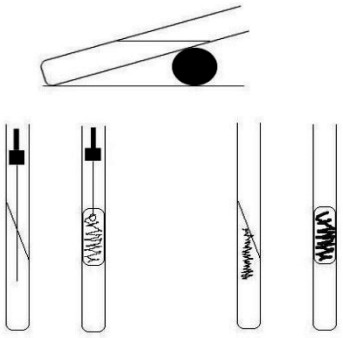
Kullanıma hazır besiyerleri içinde bir diğer örnek, gama radyasyonu ile sterilize edilmiş dehidre besiyerleridir. Bunlardan ışınlanmış tryptic soy (CASO) broth,

genellikle serum gibi steril olması gereken tıbbi malzemede sterilite testi yapmak için kullanılır. Serum içine steril koşullarda ilave edilen besiyeri kolaylıkla erir ve inkübasyon sonunda bulanıklık oluşursa serumun steril olmadığı anlaşılır. Bu testin mantığı, steril dehidre besiyerini steril kap içinde steril olması gereken sıvı ile çözerek bir çeşit besiyeri hazırlamaktır. Membran filtrasyon sisteminde bazı sporlar ile *Hydrogenophaga pseudoflava* (Syn. *Pseudomonas pseudoflava*) gibi küçük bakteriler ve *Acholeplasma laidlawii* gibi mikoplazmalar, 0,1µm porlu membran filtrelerden geçebilir ve bu nedenle membran filtre tekniği ile bu gibi bakterilerin varlığı fark edilemez. Işınlanmış tryptic soy broth yönteminde ise böyle bir olumsuzluk yoktur. Aynı yaklaşım ile sularda koliform grup bakteri ve *E. coli* ile enterokok analizinde kullanılan ReadyCult sistemi sırasıyla 14.06. ve 14.18. bölümlerde verilmiştir.

04.03.04. Bazı Özel Uygulamalar

Standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında kullanılan besiyerlerinin tamamına yakını, tüpte ya da erlende (balon, dilüsyon şişesi, vb.) broth formunda ya da Petri kutularında agar formunda hazırlanır. Bunlara ilaveten, aşağıda örnekleri verilen kullanım amaçlarına yönelik olarak özel hazırlama şekilleri de bulunmaktadır.

Tüpte yatık agar: Tanımlama, kültür koleksiyonu vb. pek çok amaçlarla kullanılan agarlı besiyeridir (Şekil 04.01). Amaç, tüpte geniş bir yüzey elde etmektir. Standart deney tüplerine 7 mL olacak şekilde tam olarak eritilmiş agarlı besiyeri dağıtılır ve otoklavlanır. Otoklav sonrasında besiyeri henüz sıvı iken tüpler bir çubuk üzerine yatırılarak katılaşması sağlanır. Bu aşamada dikkat edilmesi gereken husus, tüplerin dip kısımlarının yaklaşık 2,5 cm derinliğinde olmasıdır. *Salmonella* spp. analizinde kullanılan triple sugar iron agar, bu konuda en tipik örnektir.

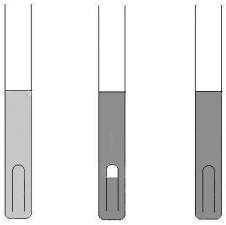


Şekil 04.01. Yatık Agar Hazırlanması

Çift kuvvetli broth: EMS ile yapılan sayımda (bknz ⇒ 08.02. Bölüm), 10 mL besiyerine 10 mL numune aktarıldığında besiyerinin derişimi yarı yarıya azalır ve burada sağlıklı bir mikrobiyel gelişme olmaz. Bunun önüne geçmek için 10 mL gıda numunesi (homojenizat) ilave edilecek tüplerde başlangıçta bu besiyerleri çift kuvvette (iki misli derişimde) hazırlanır. Örneğin, koliform grup bakteri analizinde kullanılan LST broth besiyeri, normal olarak 35,5 g/L

derişimde hazırlandığında 10 mL tüp içinde 0,355 g madde vardır. Çift kuvvetle hazırlanması gerektiğinde başlangıçta 71 g/L (0,71 g/10 mL) olarak hazırlanır, bunun üzerine 10 mL numune konulduğunda LST derişimi 0,71 g/10 mL'den 0,355 g/10 mL standart değere iner. Bu tip ekimler için yeteri büyüklükte tüp kullanılmalıdır.

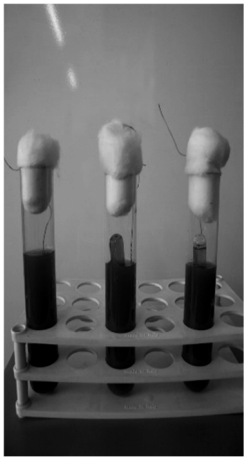
Durham tüpü olan besiyerleri: Örneğin, koliform grup bakterilerin analizinde laktozdan gaz oluşumu tipik bir reaksiyondur. Besiyerinde gaz çıkışı, standart tüpün içine ters olarak yerleştirilen ve Durham tüpü (Şekil 04.02) olarak adlandırılan küçük tüplerde gaz birikimiyle anlaşılır. Besiyeri hazırlanırken standart tüpün içine önce Durham tüpünün yerleştirilmesi ve üzerine besiyeri ilavesi ile sterilizasyon öncesinde daha az hava kalması sağlanır. Standart otoklavlamada tüpte kalan hava çıkar.



(+) (–)

Şekil 04.02. Durham Tüpü

Durham tüpü ile gaz çıkışının kontrolü, gıda sanayisinde yoğun kontaminasyonun belirlenmesi amacı ile de kullanılmaktadır (Şekil 04.03). 45 mL besiyeri ve 5 g salça alabilecek büyük boy tüplerin içine ~13x100 mm boyutlarındaki küçük tüpler Durham tüpü olarak yerleştirilir. Öncesinde Durham tüpü olarak kullanılan tüplerin boğazına delik açılarak bir misina bağlanır. Büyük tüpe Durham tüpü ve 45 mL MRS Broth eklenir. Tüpler büyük olduğu için otoklavlama sırasında Durham tüpü içinde kalan hava çıkmayabilir. Bu nedenle, Durham tüpü içindeki hava çıkartılıp otoklavda sterilize edilir (soldaki tüp). Otoklav sonrası besiyerine 5 g salça eklenir ve misina çekilerek Durham tüpü besiyeri seviyesinden 1 cm kadar yukarı çıkartılır ve inkübasyona bırakılır (ortadaki tüp). İnkübasyon sürekli olarak izlenir. Gaz çıkışı, laktobasil kontaminasyonu olduğunu gösterir (sağdaki tüp). Bu uygulamanın avantajları şöyledir:



Şekil 04.03. Durham tüpü ile salçada laktobasil analizi. GIDA (2010) 35 (4): 259-265. Gıda Teknolojisi Derneği'nin izni ile kullanılmıştır.

-Standart analizde, Petri kutusuna aktarılan numune miktarı, dökme kültürel yöntemde 0,1 g iken bu yöntem ile yapılan analizde kullanılan numune miktarı 5 g'dır. Yani analiz duyarlığı 50 misli artmıştır.

-Metabolizmaya dayalı analizlerde genel yaklaşım, "bulaşma ne kadar yüksek ise pozitif sonucun alınma süresi o denli kısadır". Burada pozitif sonuç, gaz görülmesidir. Buna göre Durham tüpünde gaz ne kadar erken görülürse bulaşma

o denli yoğundur. Paralel olarak ekilen MRS agarda koloni oluşumu henüz gerçekleşmeden önce gaz görülebilir ve işletme gereken önlemi alabilir.

Roux şişesi: Genel olarak çok miktarda mikroorganizma kültürü elde etmek amacı ile kullanılır (Şekil 04.04). Yüzey alanı ~250 cm^2 kadardır. Buna göre 100 mL kadar agarlı besiyeri ile birlikte sterilize edilir. Otoklav sonrasında düzgün bir yere yatırılarak agarın donması sağlanır. Geniş ağzından sürtme (svap) çubuğu yardımı ile yoğun bir inokülasyon yapılabilir. İnkübasyon sonrası yıkama ile kültür elde edilir. Bu işlem, hasat (harvesting) olarak da adlandırılır.

Şekil 04.04. Roux Şişesi

Laboratuvarda Roux şişesi kısıtlı ise şişenin iki yatık yüzü de kullanılabilir. Bu amaçla şişeye 100 mL kadar besiyeri ilave edilir. Eş zamanlı olarak erlende aynı besiyerinden 100 mL kadar hazırlanır, ikisi beraberce sterilize edilir. Otoklav sonrası Roux şişesi yatırılarak agarlı besiyerinin jelleşmesi sağlanır. Bu sırada erlendeki agarlı besiyeri 45 ^oC'ta sıcak su banyosunda tutulmalıdır. Roux şişesinde jelleşme tam olarak sağlandıktan sonra aseptik koşullara uyularak erlendeki agarlı besiyeri, şişenin boş olan yatık yüzüne aktarılır ve jelleşme beklenir.

Sporlandırma besiyeri: Bakteriler sadece yaşam koşulları tehdit altında iken spor oluştururlar. Açlık, yaşamı tehdit eden önemli bir faktördür. Bir diğer deyişle kısıtlı besin maddesi olan bir geliştirme ortamı, sporlu bakterileri spor oluşturmaya zorlar. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yapılan bir çalışmada (DOI: 10.15237/gida.GD18016) 8 farklı sporlandırma besiyeri içinde bileşimi $KHPO_4$: 1,0 g/L; Na_2HPO_4: 2,0 g/L; $(NH_4)_2.SO_4$: 1,0 g/L; tryptic soy broth: 4,0 g/L; yeast extract: 0.1 g/L; agar agar: 15 g/L; tuz çözeltisi: 0,6 mL/100 mL (Tuz çözeltisi: MgSO4: 1,0 g/L; $FeSO_4$: 0,1 g/L; $CaCl_2$: 10,0 g/L; $MnCl_2.4H_2O$: 0,1 g/L) olan modifiye diluted tryptic soy agar, *Bacillus cereus* için en ideal sporlandırma besiyeri olarak belirlenmiştir.

Yabani maya (non-Sacch) besiyeri: Şarap gibi alkol fermantasyonlarında kültür mayaları (*Saccharomyces* spp.) yanında hammaddeden gelen yabani mayalar da fermantasyona dâhil olurlar. Bunlar, yabani maya ya da endüstride yaygın kullanılan deyiş ile non-Sacch (*Saccharomyces* olmayan) mayalar olarak tanımlanır. Non-Sacch mayalar, alkol fermantasyonlarında istenmeyen metabolik ürünler oluşturmaları nedeniyle varlıkları benimsenmez ve fermantasyon öncesinde varlıklarının/ sayılarının belirlenmesi gerekir. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan besiyeri lysine agardır. Besiyeri bileşimindeki tek azot kaynağı lisindir. Yabani mayalar lisini kullanarak koloni oluşturabilirler ama kültür mayaları lisini kullanamadıkları için bu besiyerinde gelişip koloni oluşturamaz.

04.04. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler

Besiyerleri hazırlanırken amaç, hedef mikroorganizmanın gelişmesini optimize edecek (en uygun hale getirecek) derişimlerde gerekli besin maddelerinin dengelenmiş karışımını sağlamaktır. Bütün besin öğelerini oldukça fazla miktarda sağlayarak olabildiğince zengin bir besiyeri yapma yaklaşımı ile uygun besiyeri elde edilemez.

Örneğin, aminoasitlerin dengelenmemesi ve bir aminoasidin fazla olması, ilişkili bir aminoasidin mikroorganizma gelişmesi için kullanımını baskılayabilir. Glikoz dâhil olmak üzere tüm besin öğeleri, derişimleri arttıkça baskılayıcı etki yaparlar. %50 glikoz brothta sadece ozmofilik/ ozmotolerant mayalar gelişebilir.

Besiyeri bileşimine giren maddeler, gelişme açısından a) gelişme için gerekli olanlar, b) inhibitörler, c) diğerleri olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Gelişme için gerekli olan maddeler, doğrudan mikroorganizmaların beslenme şekilleri ile ilgilidir ve besiyeri içinde bir anlamda zorunlu olarak bulunurlar.

İnhibitörler ise gelişmesi istenmeyen mikroorganizmalar için gerektiğinde selektif besiyerlerine ilave edilir. Bunların dışında, yine gerektiğinde indikatörler, jelleştiriciler vb. pek çok madde de besiyeri bileşimine girer.

04.04.01. Su

Eski mikrobiyoloji kitaplarında temiz bir dere suyunun besiyeri hazırlamada kullanılabileceği yazılıdır, ancak günümüzde başta çevre kirliliği ve analizde standardizasyon gerekliliği nedeniyle bu uygulama geçerliliğini tümüyle yitirmiştir. Bugün mikrobiyoloji laboratuvarlarında besiyeri hazırlamak için saf su kullanılmaktadır. Kullanılan suyun kalitesi yetersiz ise besiyeri verimliliğinde önemli ölçüde düşme görülebilir. Basit bir ifade ile besiyeri hazırlamada kullanılan su içinde besin maddeleri ve toksik bileşenler bulunmamalı, suyun özdirenci 0,3 MΩ.cm'den büyük olmalı, klor ve ağır metaller bulunmamalıdır. Klor ve ağır metallerin varlığına çok düşük konsantrasyonlarda izin verilebilir. Saf suyun iletkenliği (kondüktivitesi) 10 µS'ten (mikro siemens) düşük olmalıdır (İletkenlik:1/ özdirenç). Damıtma ya da arıtma sistemlerinden elde edilen saf su steril değildir, ancak mikrobiyolojik olarak temiz olması istenir. Taze hazırlanmış saf suda izin verilebilecek toplam mezofil aerop bakteri sayısı en çok 10^3 ve tercihen $<10^2$ KOB/mL'dir. Besiyeri hazırlamak için her zaman taze hazırlanmış su kullanılmalıdır.

Günümüzde aktif karbon, ters ozmoz ve elektrodeiyonizasyon tekniklerinin kombinasyonu ile elde edilen saf su sistemlerinde klor ve benzer oksidanlar tümüyle arındırılmakta, 5 MΩ.cm'den daha yüksek özdirenç ve düşük organik madde içeriği (< 30 µg/L) olan saf su elde edilebilmektedir. Bu sistemlere 0,2 µm porlu membran filtre ilavesiyle yüksek mikrobiyolojik kalite sağlanmaktadır.

Saf suyun damıtma yöntemi ile elde edildiği cam ya da paslanmaz çelik cihazlar hâlen pek çok mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılmaktadır. Bunlardan cam olan sistemlerde damıtılacak sudaki iyonların geçişi en az düzeydedir, ancak soğutma suyu kullanımı çok fazla olduğu için tercih edilmemektedir. Paslanmaz çelik damıtma sistemlerinde ise soğutma suyu kullanımı cam damıtma sistemlerine göre çok daha azdır, ancak düşük paslanmaz çelik kalitesine göre iyon geçişi olmaktadır.

Saf suyun depolanacağı kaplar, ağzı kapaklı cam ya da plastik (PP ya da PE) olmalıdır. Bu kaplarda zamanla alg gelişimi olabilir ve alg metabolitleri, bazı duyarlı bakterilerin gelişimini baskılayabilir. Bu nedenle saf su karanlıkta depolanmalı ve kaplar belirli aralıklarla temizlenmelidir.

Taze hazırlanmış saf suyun pH'sı 6,5-7,5 arasında olmalıdır. Depolanmış saf su, atmosferik karbondioksitin absorbe edilmesi sonucu asit pH gösterir. Saf suyun pH'sı düşük iyon varlığı nedeniyle her zaman doğru şekilde ölçülemeyebilir. Eğer hazırlanmış besiyeri pH'sında sorun yoksa hazırlamada kullanılan suyun pH'sının ölçülmesi gerekli değildir. Saf su pH'sının ölçülmesi gerekiyorsa 100 mL suya 0,30 mL doymuş (~3-4M) KCl çözeltisi ilave edilir ve iyice karıştırılıp pH ölçülür. Bu miktarda KCl ilavesi saf suyun pH'sını etkilemez, ancak iyon dengesini yükselttiği için doğru ölçüm sonucu elde edilmiş olur.

04.04.02. Peptonlar

Pepton terimi, proteinlerin hidrolizi ile elde edilen ürünlere verilen genel isimdir. Bu terim ilk kez R. Koch'un çalışma arkadaşlarından Nägeli tarafından 1880 yılında kullanılmıştır. Nägeli, kemoorganotrofların kısmen parçalanmış (hazmedilmiş, sindirilmiş) protein içeren besiyerinde iyi geliştiklerini açıklayan ilk bilim insanıdır.

Yaşayan tüm hücrelerde olduğu gibi mikroorganizmalar da azot, karbon, tuzlar ve diğer besin maddelerine gereksinim duyarlar. İstisnalar dışında, mikroorganizma gruplarının oldukça büyük bir bölümü, proteinleri azot kaynağı olarak kolaylıkla kullanamaz. Bu nedenle azotlu bileşikleri, çok daha kolay kullanabildikleri protein hidrolizatlarından sağlarlar.

Peptonlar sadece azot değil, karbon kaynağı olarak da mikroorganizmalar tarafından kullanılır. Bunun yanında, peptonların bileşiminde bulunan bazı aminoasitler ve vitaminler de bazı mikroorganizmalar için gelişme faktörü olarak oldukça önemli işlev görür.

Proteinler, kuvvetli asitler ve kuvvetli alkaliler ile ya da enzimatik olarak temel bileşenleri olan peptit ve aminoasitlere ayrışır. Bu amaçla en çok kullanılan proteolitik enzimler papain, pepsin ve pankreatindir.

Peptonlar, birçok ticari firma tarafından çeşitli bitki ve hayvan dokularından farklı yöntemlerle elde edilip farklı ticari isimlerle pazarlanır ve/veya dehidre besiyerleri içine katılır.

Ham madde ve üretim yöntemi farklılığı, doğal olarak peptonların bileşimlerinde de farklılıklar oluşturur. Dolayısı ile değişik amaçlar için farklı bileşimdeki peptonlar kullanılır.

Proteinler, aminoasit zincirlerinden oluşmuş makro moleküllerdir. Aminoasitler birbirlerine peptit bağları ile bağlanırken 1 molekül su açığa çıkar. Peptit bağlarının kuvvetli asitler kullanılarak yüksek basınç ve yüksek sıcaklık altında tam olarak kırılması, böylece proteinin tümüyle kendisini oluşturan aminoasitlere dönüştürülmesi mümkün değildir. Bu işlem sırasında bazı aminoasitler (örneğin triptofan) tümüyle kaybolur. Sistin, serin ve treonin zarar görürken asparajin ve glutamin etkilenmez. Benzer şekilde, pepton bünyesindeki vitaminler ciddi ölçüde zarar görür. Bu işlem sırasında karbohidratlar ile aminoasitler arasında meydana gelen bir seri tepkime sonunda oluşan bazı kimyasallar, mikroorganizma gelişimi için toksik olur. Bu nedenle kuvvetli asitler ile peptonların elde edilmesinde peptit bağlarının tümünün değil mikroorganizma için yeterli azot kaynağı sağlayacak düzeyde sadece bir kısmının kırılması hedef alınır.

Proteinlerin enzimatik olarak parçalanması, asit hidrolizine kıyasla pepton bileşimine daha az zarar verir. Kullanılan enzimler peptit bağlarına özel olup sadece bu bağlarda parçalanmaya neden olur. Dolayısıyla, elde edilen peptonda kullanılan enzimin çeşidine göre protein parçalanma ürünü olan polipeptitler bulunur. Teorik olarak, farklı enzimler kullanılarak proteini oluşturan tüm aminoasitlere kadar parçalanma mümkün ise de pratik uygulamada bunun bir önemi yoktur ve besiyeri bileşiminde kullanılacak proteinler sadece amaca uygun şekilde ve belirli düzeyde parçalanarak peptonlar elde edilir.

Günümüzde ticari olarak üretilen ve pazarlanan peptonların hemen hemen tümü, enzimatik olarak elde edilmektedir. Sadece kazein, asidik tepkime ile hidrolize edilir. Bazik olarak elde edilen peptonun ticari üretimi yoktur. Son zamanlarda BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy: Deli inek hastalığı[2]); tehlikesine karşı bazı ticari firmalar, hayvansal dokulardan elde edilen peptonların BSE içermediğine ilişkin sertifika vermektedir.

Mikrobiyolojinin değişik alanlarında farklı peptonlar kullanılır. Besiyerlerinin bileşiminde farklı peptonlar kullanılabilirken aşı üretimi için bitki kökenli peptonlar uygun değildir. Buna karşın bitkisel peptonlar enzim üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabilir. Dolayısıyla besiyeri formülden hazırlanmak zorunda ise formülde verilen peptonun kullanılması gereklidir.

Peptonlar, mikrobiyolojide tek başlarına besiyeri olarak kullanılabilen ender maddeler arasındadır. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren pek çok bakteri, bileşimi sadece %1 pepton olan besiyerinde kolaylıkla geliştirilebilir.

[2] Türkçede hatalı olarak "deli dana" hastalığı deyişi kullanılmaktadır. Orijinali "mad cow" olup, doğrudan "deli inek" olarak kullanılmalıdır.

Aksine bir belirtme yoksa mikrobiyolojide "pepton" denildiğinde pankreatin enzimi ile hidrolize edilmiş et peptonu (peptone from meat, pancreatic) anlaşılır. Bu pepton, farklı ticari firmalar tarafından farklı isimlerle anılır.

04.04.03. Maya Ekstraktı

Maya ekstraktı (maya özütü, yeast extract), proteolitik olarak otolize edilmiş (parçalanmış) bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Özellikle, yüksek B kompleks vitamini derişimi sayesinde çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar.

Bileşimindeki aminoasitler, peptitler, vitaminler, karbohidratlar ve mineraller sayesinde pek çok mikrobiyolojik çalışmada besiyeri katkısı olarak kullanılır. Karbohidrat içermesi nedeniyle tanımlama amaçlı karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde (bknz⇒ 06.04.03.10. bölüm) kullanılmaz.

Maya ekstraktı üretiminde otoliz düzeyi sürekli olarak kontrol edilir ve otolitik aktivite ısıtma ile durdurulur. Böylelikle B kompleks vitaminleri korunmuş olur.

04.04.04. Et Ekstraktı

Et ekstraktı (et özütü, meat extract), genellikle yağı ve tendonları ayrılmış ve ekstraksiyon öncesi hafifçe hidrolize edilmiş etten elde edilir. Karbohidrat içermez. Bu nedenle, karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılabilir. Çeşitli besiyerlerinde et peptonlarının yerini alabilir.

04.04.05. Malt Ekstraktı

Malt ekstraktı (malt özütü, malt extract), biralık arpanın çimlendirilmesi ve kavrulması ile elde edilen malttan üretilir. Başta maltoz olmak üzere, içerdiği çeşitli karbohidratların yüksek derişimine bağlı olarak maya ve küflerin geliştirilmesi için kullanılır. %1,7 derişimdeki çözeltisi, maya ve küflerin geliştirilmesi için uygun bir besiyeridir. Gerekirse bu çözelti, çeşitli peptonlar ile desteklenebilir ve/veya asitlendirilebilir ve/veya agar ve pepton eklenerek malt extract agar şeklinde katı besiyeri olarak kullanılabilir.

04.04.06. Beyin ve Kalp Ekstraktı

Beyin ekstraktı (brain extract) ve kalp ekstraktı (heart extract) streptokoklar, pneumokoklar, meningokoklar, gonokoklar vb. gibi zor gelişen (fastidious) patojen bakterilerin geliştirilmesi için brain heart broth, brain heart infusion ve brain heart agar gibi isimlerle anılan besiyerlerinin bileşimine katılır. Ayrıca çeşitli toksin testleri için patojenlerin bu besiyerinde geliştirilmesi önerilmektedir.

04.04.07. Agar

Besiyerlerinin katı hale getirilmesi amacıyla en çok kullanılan jelleştiricidir. Çoğu kez diğer agarlı besiyerleri ile karıştırılmaması için "agar agar" olarak anılır. Agar, bir poligalaktozit olup "*Agarophytes*" olarak adlandırılan bazı kırmızı deniz yosunlarından (*Gelidium*, *Eucheuma*, *Gracilaria*, *Acanthopeltis*, *Ahnfeltia* ve *Pterocladia* türleri) elde edilir. Bazı hidroksil grupları sülfürik asit ile esterleştirilmiştir. Mikrobiyolojik kullanım amacıyla en iyi kalitedeki agar, *Gelidium* türünden elde edilir. Gıda sanayisinde de jelleştirici olarak kullanılan agar, yeteri kadar saf olmadığı durumlarda mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

Agarın katılaştırma (jelleştirme) özelliğini bileşimindeki D-galakton sağlar. Bileşiminde ayrıca inorganik tuzlar, çok az miktarda protein benzeri maddeler ve eser miktarda yağ vardır. Mikrobiyolojide kullanılan agarlar, özel olarak saflaştırılarak antimikrobiyel maddeler ve pigmentlerden arındırılır. Bileşiminde bulunan agaroz ve agaropektin adlı iki polisakkarit, agarın etkisini belirler. Agaroz, agarın yüksek jelleştirme özelliğinden sorumlu iken agaropektin viskoz özellik verir. Agardaki agaroz/ agaropektin oranı, ham maddeye göre değişir. Agardaki agaroz oranı en çok %75'e kadar çıkabilir. Özel çalışmalarda saf agaroz kullanılır.

Agar, besiyeri bileşimine sadece jelleştirici olarak katılır. Uzun ve dallanmış zincir yapısı nedeniyle birkaç istisna dışında mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılamaz.

Yaklaşık olarak 85-90 ºC'ta erir, 40-45 ºC'ta jelleşir. Gerek erime gerek jelleşme sıcaklığına besiyeri pH'sı etkilidir. Besiyeri pH'sını etkilemez, ancak düşük pH'dan olumsuz şekilde etkilenir. 6'dan daha düşük pH'ya sahip besiyerlerinde genel olarak daha fazla agar kullanılır. Besiyeri pH'sı 5 ve daha altında olacak ise bu besiyeri nötral pH'da otoklavlanır ve 45 ºC'a soğutulup gerekli miktar asit ilave edilir. Bu şekilde hazırlanmış besiyerleri tekrar eritilirse agar jelleşme özelliğini tümüyle yitirir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan potato dextrose agar için "eğer analiz edilecek numunede bakteri bulaşı (kontaminasyonu) yoğun ise bazal besiyeri otoklavlanıp ~45 ºC'a soğutulur ve sonra üzerine sterilize edilmiş %10 tartarik asit çözeltisinden 14 mL/L derişimde olacak şekilde ilave edilir. Böylece pH ~3,5'e düşer. Bakteriler bu pH'da gelişemez ancak maya ve küfler rahatlıkla gelişebilir" ifadesine sıklıkla rastlanır. Bu uygulamada pH'nın tam olarak 3,5 olması gerekli değildir. Ancak bazı besiyerlerinde pH'nın ne olduğu önemlidir ve pH özel olarak ayarlanır.

Agarın jelleşme sıcaklığı bazı kaynaklarda 32-39 ºC olarak verilmektedir. Döküm sırasında Petri kutularının oda sıcaklığında (20-25 ºC) olduğu ve dolayısıyla Petri kutusu ile besiyeri arasında ısı değişimi olacağı dikkate alınarak döküm sıcaklığının 40 ºC'tan daha düşük olmaması gerekir.

Besiyerine, amaca göre, %0,05-2 gibi geniş bir sınırda agar ilave edilebilir. Düşük agar derişimleri (%0,05-0,3), genellikle hareketliliğin belirlenmesi ve mikroaerofil karakterdeki bakterilerin geliştirilmesi gibi özel amaçlarla kullanılır. Standart kullanım derişimi %1-1,5'tir. Yüksek derişimler ise yüksek asitli besiyerlerinde agarın jelleşme özelliğini koruması amacıyla kullanılır. Yukarıda da belirtildiği gibi agar yüksek sıcaklıkta yüksek asitlikten olumsuz etkilenir. Daha yüksek agar derişimi, bu olumsuzluğu gidermek içindir.

04.04.08. Karbohidratlar

Bazı besiyerlerinin bileşimine bakteriler için enerji ve karbon kaynağı olarak katılan karbohidratların bir başka kullanım şekli, karbohidratlardan asit oluşturmaya dayalı tanımlama (identifikasyon) testleridir (bknz ⇒ 06.04.03.10. Karbohidrat testleri bölümü).

Besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak en çok kullanılan karbohidratlar glikoz, laktoz ve sakkarozdur. Bunlardan glikoz, pek çok bakteri tarafından kullanılabildiği için yaygın olarak genel besiyeri bileşimlerinde yer alır.

Adonitol, arabinoz, dekstroz (glikoz), dulsitol, galaktoz, inositol, inulin, ksiloz, laktoz, levuloz (früktoz), maltoz, mannitol, mannoz, melezitoz, melibiyoz, nişasta, rafinoz, ramnoz, sakkaroz, salisin, sellobiyoz, selüloz, sorbitol ve trehaloz çeşitli karbohidrat testlerinde kullanılmak üzere sıvı, katı ya da yarı katı kombine besiyerlerine katılabilmektedir.

Glikoz, laktoz, sakkaroz ve sorbitol gibi bazı karbohidratlar, çeşitli katı besiyerlerine yine karbohidratlardan asit oluşumunun izlenmesi ve buna göre kolooninin ön tanımlaması amacı ile katılır. Basit bir örnek ile koliform grup bakteriler, laktozu kullanarak asit oluştururlar. Katı besiyerinde uygun bir pH indikatörü kullanılarak laktozdan asit oluşturan kolonilerin farklı renk alması sağlanır. Ya da tersine olarak *E. coli* O157:H7 serotipi, sorbitol negatif[3] karakterdedir. Besiyerinde gelişen sorbitol pozitif bakteriler, pH indikatörü aracılığı ile kırmızı renkli koloni oluştururken *E. coli* O157:H7 serotipi, renksiz koloni oluşturarak sorbitol pozitif olanlardan ayrılır.

Koliform grubu bakterilerin geliştirileceği besiyerlerinin hemen hepsinde karbon kaynağı olarak laktoz kullanılır. Koliformların analizi için hazırlanmış sıvı besiyerlerinde laktozdan gaz oluşumu bu grup için belirleyicidir. Gaz çıkışı basit olarak Durham tüpü ile belirlenir.

[3] Örneğin "sorbitol negatif" deyimi, bahsedilen mikroorganizmanın (tipik örnek *E. coli* O157:H7 serotipi), sorbitolü karbon ve enerji kaynağı olarak metabolize edemediği/ kullanamadığı anlamına gelir. Koliform grup bakterilerin "laktoz pozitif" olarak tanımlanması ise bu grubun laktozu karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiklerini ifade eder.

Nişasta kullanımı (hidrolizi), *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı bakteriler için tipik olduğundan bazı özel besiyerlerinin bileşimine katılır. GSP agar buna örnek olarak verilebilir.

Genel olarak, karbohidratların çözelti halinde filtrasyon ile sterilize edilmesi ve otoklavdan çıkmış bazal besiyerine katılması önerilir. Ancak çeşitli besiyerlerinin bileşimine katılan glikoz, laktoz, sorbitol ve sakkaroz gibi şekerler, bileşimden hazırlanan besiyeri ile birlikte otoklavda da sterilize edilebilir. Çünkü pek çok dehidre besiyerinin bileşiminde bu karbohidratlar zaten vardır.

04.04.09. Tuz

Aksine bir belirtme yoksa "tuz" denilince NaCl (sodyum klorür[4]) anlaşılır. Çoğu besiyerinin bileşimine izotonik bir ortam oluşturmak için katılır. %0,85 NaCl, serum fizyolojik adı ile seyreltme çözeltisi olarak yaygın olarak kullanılır. Klinik birimlerde bu isim ile bilinen çözelti de (%0,9 NaCl) budur ve insan vücudu için de aynı şekilde izotonik denge oluşturur.

Tuza dayanıklı (halotolerant) ve tuz seven (halofil) bakterilerin selektif izolasyonu için yüksek derişimlerde (örneğin ~%10) özel besiyerlerinin bileşimine katılır.

04.04.10. Tampon Maddeler

Bakteriler, çok genel olarak nötr ve nötre yakın pH'larda iyi gelişir. Bazı mikroorganizmalar alkali pH'ları yeğlerken (örneğin *Rhizobium* spp.) bazıları (örneğin mayalar, küfler ve asidofilik bakteriler) asidik ortamları severler. Toplam mezofil aerop bakteri sayımında olduğu gibi bir besiyerinde elden geldiğince çok sayıda bakteri türü geliştirilmesi isteniyorsa pH, nötre yakın değerde olmalıdır. Tersine olarak geliştirilmesi istenen mikroorganizma, yüksek asitliğe veya yüksek alkaliliğe dirençli ise ya da sadece yüksek asit veya yüksek alkali ortamda gelişebiliyorsa besiyeri pH'sı bu mikroorganizmanın gelişebileceği pH'ya ayarlanmalıdır.

Asitlik/ alkalilik, besiyerlerine seçicilik (selektivite) kazandırmak amacıyla çok kolay ve dolayısıyla çok yaygın olarak kullanılan bir faktördür. Örneğin, maya ve küfler ile asidofilik bakterilerin geliştirileceği ortamlarda pH düşürülerek pek çok bakterinin gelişmesi kayda değer ölçüde baskılanır.

Metabolizmaya bağlı olarak besiyeri pH'sında değişmeler meydana gelir. Sadece pepton olan ortamda geliştirilen bakteriler pH'yı yükseltir. Buna karşın bileşiminde pepton yanında mikroorganizmanın kullanabileceği karbohidrat da olan besiyerinde karbohidrat tükenmediği sürece pH düşer. Karbohidrat tükenir

[4] Kimi Türkçe kaynaklarda, NaCl karşılığı olarak gereksiz yere sodyum klorit ya da sodyum klorid ifadesine rastlanmaktadır. Doğrusu sodyum klorür şeklindedir. Devamında H_2S karşılığı olarak hidrojen sülfit ya da ya hidrojen sülfid değil doğrusu hidrojen sülfür şeklindedir.

ve halen pepton varsa bu kez karbon ve enerji kaynağı olarak pepton kullanılmaya başlanır ve pH yeniden yükselir.

Salmonella analizlerinde olduğu gibi bazı çalışmalarda inkübasyon sırasında pH'nın değişmesi, gelişmesi istenen mikroorganizmaya zarar vereceği için istenmez. pH değişiminin minimumda tutulması amacıyla besiyerine çeşitli tampon maddeler ilave edilir.

Büyük ölçekli endüstriyel üretimlerde pH stabilitesi tampon eklenerek değil, belirli pH aralığında tutmak üzere "pH-stat" denilen sistemlerle dışarıdan asit ya da baz ilavesi ile yapılır.

Tampon (buffer) olarak en çok kullanılan maddeler, fosfatlar (K_2HPO_4, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, ß gliserofosfat), karbonatlar, asetatlar ve sitratlardır. Basit olarak, %10 skim milk besiyerine ~1 g/10 mL kalsiyum karbonat ilavesi ile laktik asit bakterilerinin oluşturduğu asitlik kayda değer ölçüde tamponlanır.

Çizelge 04.01'de 4,8-8,0 pH arasında tampon çözelti hazırlamak için kullanılan tamponlar gösterilmiştir. Buna göre;

-Çözelti "A": 0,067 M KH_2PO_4 (9,073 g/L KH_2PO_4) ve
-Çözelti "B": 0,067 M Na_2HPO_4 (11,866 g/L Na_2HPO_4) olacak şekilde hazırlanır.

Çizelge 04.01. Tampon çözelti hazırlamak için "B" çözeltisinden alınacak miktar (mL)

pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"
4,80	0,35	5,40	3,00	6,00	12,1	6,60	37,1	7,20	72,6	7,80	93,6
4,90	0,60	5,50	3,90	6,10	15,0	6,70	43,0	7,30	77,7	7,90	95,5
5,00	0,95	5,60	4,90	6,20	18,4	6,80	49,2	7,40	81,8	8,00	96,9
5,10	1,35	5,70	6,20	6,30	22,1	6,90	55,2	7,50	85,2		
5,20	1,80	5,80	7,90	6,40	26,4	7,00	61,2	7,60	88,5		
5,30	2,30	5,90	9,80	6,50	31,3	7,10	67,0	7,70	91,2		

* Kaynak: www.kimyaevi.org. Bu çizelgenin daha ayrıntılı şekli, www.kimyaevi.org adresli sitede vardır.

Örnek: pH'sı 5,90 olan tampon çözelti hazırlanmak isteniyorsa çizelgeden 5,90'ın karşılığı olarak 9,80 mL bulunur. Bu miktar "B" çözeltisinin (Na_2HPO_4) üzerine 100 mL'ye tamamlayacak şekilde 90,20 mL "A" çözeltisi (KH_2PO_4) eklenir. Besiyeri bileşimine giren maddeler tartılır, su yerine bu çözelti kullanıldığında besiyeri pH'sı 5,90'a tamponlanmış olur. Hazırlanan tampon çözeltisinin güvenilir olması için "B" çözeltisi üzerine "A" çözeltisi ekleme işleminin pH metre kontrolü ile yapılması önerilir.

04.04.11. pH İndikatörleri

Mikrobiyel metabolizma sonunda bazı besiyeri bileşenlerinden çeşitli asit veya alkali ürünler meydana gelir. pH'daki değişme en kolay olarak pH indikatörleri ile belirlenir ve bunların renk değişimine bağlı tepkimeler, o besiyerinde gelişen mikroorganizmalar için önemli göstergeler olur.

Aşağıda (Çizelge 04.02), besiyeri bileşimlerinde yaygın olarak kullanılan pH indikatörleri ve pH'ya bağlı renkler verilmiştir.

Bunlara ek olarak, kimyasal analizlerde kullanılan pek çok pH indikatörü bulunmakla birlikte, besiyeri bileşimine girenler sınırlıdır. İndikatör, öncelikle geliştirilmesi istenen mikroorganizmaya zarar vermemelidir. Ayrıca besiyerinde stabilite, hedef pH'larda kesin renk dönüşümü vb. özellikleri de olmalıdır.

Çizelge 04.02. pH indikatörleri ve renk değişim sınırları

İndikatör	Asit pH / renk	Alkali pH / renk
Phenol blue	3,0 / sarı	4,9 / mavi
Phenol red	6,8 / sarı	8,4 / kırmızı
Bromocresol green	3,8 / sarı	5,4 / mavi
Bromocresol purple	5,2 / sarı	6,3 / menekşe
Bromothymol blue	6,0 / sarı	7,6 / mavi
Cresol red	7,2 / sarı	8,8 / kırmızı
Litmus	5,6 / kırmızı	8,3 / mavi
Metil red	4,4 / kırmızı	6,2 / sarı
Neutral red	6,8 / kırmızı	8,0 / sarı
Rosalic acid	6,8 / sarı	8,2 / kırmızı

04.04.12. Redoks İndikatörleri

En yaygın olarak kullanılan redoks indikatörü, TTC (2,3,5 Triphenyl-tetrazolium chloride)'dir. Enterokokların selektif geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılır ve buna bağlı olarak enterokok besiyerlerinin bileşimlerinde 0,1 g/ L derişimde yer alır. Enterokoklar TTC'yi indirgeyerek kırmızı renkli bir bileşiğe (formazon) dönüştürürler. Bu şekilde besiyerinde oluşan kırmızı renkli kolonilerin enterokok olduğu anlaşılır. TTC, otoklav çıkışı plate count agara 50 ppm derişimde (basitçe 100 mL PCA besiyerine %0,5 TTC'den 1 mL) eklenerek kolonilerin daha rahat sayılması sağlanabilir. Bu uygulama, salça gibi kırmızı renkli gıda numunelerinin analizine uygun değildir. TTC'nin membran filtre ile sterilizasyonu ve otoklav sonrası ~45 ºC'a soğutulmuş agarlı besiyerine ilave edilmesi önerilmektedir.

Resazurin, yaygın olarak kullanılan bir diğer redoks indikatörüdür. Çiğ sütlerde metabolizmaya dayalı bir sayım yönteminde kullanılmasına karşın sütte antibiyotik ya da gelişmeyi engelleyici bir madde bulunması halinde doğru sonuç alınamaz.

04.04.13. Diğer İndikatörler

Mikrobiyel metabolizmaya bağlı olarak, bazı kimyasalların çeşitli tepkimeler sonucu oluşturdukları belirli ürünlerin saptanması, bu besiyerlerinde gelişen mikroorganizmaların ön tanımlanmasında kullanılır. Bu tip tepkimelerde kullanılan indikatör örnekleri aşağıda verilmiştir:

-MUG (4-Methylumbelliferyl-ß-Glucuronide): *E. coli* tanımlanmasında son yıllarda en yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir. *E. coli* O157:H7 dışındaki *E. coli* serotiplerinde bulunan ß-D-Glucuronidase (MUGase) enzimi, MUG'u uzun dalga boylu (366 nm) UV lamba ile floresan ışıma veren bir bileşiğe (methylumbelliferone) parçalar. MUG hakkında 14.08. *E. coli* biyotip 1 analizi bölümünde ayrıntılı bilgi verilmiştir. Floresan ışıma, loş bir ortamda belirgin bir şekilde görülür. Yeni nesil sahte para makineleri, bu amaçla kullanıma uygun değildir.

-MUP (Methylumbelliferyl-phosphate): *Cl. perfringens* için karakteristik olan asit fosfataz enzimi, MUP'u yine uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışıma veren bir bileşiğe (methylumbelliferone) parçalar (bknz⇒ 14.12. *Cl. perfringens* analizi bölümü).

-Kan: Aksine bir uyarı yoksa besiyeri bileşimine giren "defibrine koyun kanı"dır. Hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi için kullanılır (bknz⇒ 06.04.03.24. Hemoliz testi bölümü). Gıda mikrobiyolojisinde *Listeria* tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır.

-Jelatin ve kazein: Bunlar, proteolitik bakterilerin belirlenmesi amacıyla besiyeri bünyesine katılır. Jelatin kullanılan yöntemde inkübasyon sonrası soğutulan besiyerinin katılaşmaması, jelatinin hidrolize edildiğini gösterir. Kazein kullanılan yöntemde ise proteolitik bakteri kolonileri etrafında proteolize bağlı olarak berrak zonlar meydana gelir.

-Lesitin: Yumurta sarısı ve soya fasulyesinde bulunan lesitin, çeşitli bakterilerdeki lesitinaz enzim aktivitesi sonunda parçalanır ve lesitin katılmış katı besiyerinde koloni etrafında berrak zonlar görülür. Gıda mikrobiyolojisinde *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* analizinde kullanılan besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

-Kromojenik substratlar: Katı besiyerinde karbohidrat ve pH indikatörüne bağlı selektif izolasyon sistemi yerine, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl, 5-bromo-6-chloro-3-indolyl ya da 6-chloro-3-indolyl gibi indolil türevleri olan kromojenik substratların kullanımı giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu sistemin prensibi, kromojenik substratın hedef bakteri ya da bakteri grubu için özgün olan enzim tarafından şeker ve kromojene parçalanması, oksijen varlığında sıvı besiyerinin ya da katı besiyerindeki koloninin renk değiştirmesidir. Klasik pH indikatöründen farklı olarak bu sistemde koloni etrafında zon oluşmaz, doğrudan koloni rengi değişir. Kromojenik besiyerlerinde oluşan renk, besiyerine difüze olmadığı (yayılmadığı) için ışık, pH ve sıcaklık gibi olumsuzluklardan etkilenmez ve sabit kalır.

-Tributirin: Lipolitik aktivitenin belirlenmesi için kullanılır. Lipolitik bakteri kolonileri etrafında lipoliz sonunda berrak zonlar oluşur.

04.04.14. İnhibitörler (Baskılayıcılar)

Selektif besiyeri bileşimlerinde istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini baskılayan çeşitli inhibitör (baskılayıcı) maddeler kullanılır. İnhibitör maddelerin etki şekilleri çok farklıdır ve güçleri derişimlerine bağlıdır.

Bir yaklaşıma göre, her maddenin yüksek derişimde inhibisyon (baskılama) etkisi vardır. Örneğin, pek çok besiyerine ozmotik basınç sağlamak için katılan NaCl, yüksek derişimlerde mikroorganizmaların çoğunun gelişimini engeller. Pek çok mikroorganizma için karbon kaynağı olarak kullanılan glikoz, %50 derişimde ozmofilik/ ozmotolerant mayaların gelişimine izin verirken diğer tüm bakteri, maya ve küflerin gelişimi üzerinde baskılayıcı bir etki gösterir.

Besiyerlerinde inhibitör olarak kullanılan maddeler, genel ve selektif (seçici) inhibitörler olarak kabaca ikiye ayrılabilir. Genel inhibitörler daha geniş bir yelpazede istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini engellerken selektif inhibitörler belirli mikroorganizmaların gelişimini etkiler. Genel inhibitörler geniş spektrumlu antibiyotik gibidirler. Gıda mikrobiyolojisinde selektif inhibitörler kullanılır. Genel inhibitör kullanımı çok nadirdir.

İnhibitör etki, yukarıda belirtildiği gibi öncelikle derişime bağlıdır. Bunun dışında mikroorganizma cinsi ve hatta türü ile serotipi inhibisyonda önemlidir. Örneğin, *E. coli* O157:H7 serotipi, diğer *E. coli* serotipleri ve refakatçi floraya kıyasla sefiksim-tellurit kombinasyonuna kayda değer ölçüde direnç gösterir. Belirli bir madde (örneğin tellurit), bazı bakteriler için inhibitör etki yaparken bazı bakteriler telluriti metalik tellüre (tellurium) indirger; sonuçta gri-siyah renkli koloni oluşumu stafilokok ve mikrokoklar için tipik bir morfolojik göstergedir.

İnhibitör olarak kullanılan maddenin görevi, kullanıldığı derişimde istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini olabildiğince baskılamak iken gelişmesi istenen mikroorganizma için inhibitör etki yapmaması gerekir. Bu etki, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) ile ifade edilir. Sadece belirli bir türün dışındaki tüm mikroorganizmaların gelişimini etkileyen inhibitör madde ve dolayısı ile tek bir türe selektif besiyeri yoktur. Bilinen en yüksek etki gösteren inhibitörlerden birisi Cetrimide (cetyltrimethylammonium bromide) olup *Pseudomonas aeruginosa* dışında pek çok refakatçi florayı baskılar ve bu nedenle *Pseudomonas* besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

Besiyerlerinin bileşimine katılan inhibitörler, gelişmesi hedeflenen mikroorganizmanın yakın akraba türlerini çoğunlukla baskılayamaz. Buna bağlı olarak besiyerinde tek inhibitör yerine birden fazla inhibitör de kullanılabilir ya da çeşitli indikatörler kullanılarak hedef mikroorganizmanın diğer türlerden koloni morfolojisi farklılığı ile ayrılması hedeflenir.

Baskılayıcı olarak kullanılan tüm maddelerin hangi mikroorganizmalar için hangi derişimde ve hangi mekanizma ile inhibisyon etkisi sağladığını listelemek, bu kitabın konu kapsamı dışındadır. En çok kullanılan inhibitörler hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir:

-Boyalar: Metakrom sarısı (metachrome yellow) *Proteus* kolonilerinin yayılmasını, eosin Y ve metilen mavisi (methylen blue) Gram pozitif bakterilerin gelişimini ve malahit yeşili (malachite gren) *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki pek çok refakatçi floranın gelişimini baskılar.

-Sodyum azid: Gram negatif bakterilerin gelişimini engeller.

-Safra tuzları (bile salts, ox bile): Gram pozitif bakterilerin gelişimini engeller.

-Antibiyotikler: Genellikle bakterileri engellemek için geniş spektrumlu olarak küf geliştirme besiyerlerinde ya da refakatçi bakteriyel florayı inhibe etmek için dar spektrumlu olarak kullanılırlar. Örneğin, *Bacillus cereus*, refakatçi floraya göre polimiksin B sülfattan daha az etkilendiği için bu bakteri ile ilgili çalışmalarda besiyeri bileşimine katılır. Benzer şekilde *E. coli* O157:H7 serotipi ile ilgili çalışmalarda sefiksim yaygın olarak kullanılır.

-Deoksiçolat (deoxycholate): Gram pozitif bakterileri, kısmen koliformları ve zayıf olarak *Shigella* spp.'yi engeller. *Salmonella* besiyerlerinin çoğunda bulunur.

Ayrıca selenit, tetratiyonat, bizmut, lauryl sülfat, yüksek derişimde asetat vb. maddeler çeşitli besiyerlerinde inhibitör madde olarak kullanılır.

04.04.15. Diğer Maddeler

Besiyerlerine çeşitli amaçlarla katılan ve yukarıdaki gruplara girmeyen daha pek çok madde vardır. Bunlardan bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

-İnaktivatörler: Lesitin, sistein, Tween 20 ve Tween 80 gibi maddeler, başta ilaç ve kozmetik endüstrisinde ham madde, ara ürün ve son ürünlerdeki çeşitli antimikrobiyel maddeleri inaktive ederek bu gibi ürünlerde bulunması olası mikroorganizmaların belirlenmesini sağlarlar.

-Stimülatörler (Gelişmeyi teşvik ediciler): Analiz edilen örnekte gelişmesi istenen mikroorganizmayı teşvik etmek amacıyla besiyeri bileşimine çeşitli maddeler katılabilir. Bunlar arasında vitaminler, glisin, pirüvat, Tween 80 ve çeşitli elementler ilk akla gelenlerdir.

-Özel besin maddeleri: Besiyeri içinde gelişmesi istenen mikroorganizmanın kullanabileceği ancak diğerlerinin besin maddesi olarak yararlanamayacağı çeşitli maddeler yer alabilir. Bunlara en tipik örnek, azot kaynağı olarak nitrat (NO_3) kullanılmasıdır. Özel besin maddeleri olarak nişasta ve glutamat da kullanılabilir.

-İndirgeyiciler: Anaerobik ortam oluşturmak için çeşitli maddeler kullanılır. Bunlar arasında ilk akla gelen thioglycollate'tır.

-Doğal ortam oluşturanlar: Bazı bakterilerin gelişmesini teşvik etmek için onların doğal olarak bulundukları ortamlardaki çeşitli maddeler besiyerine katılır. Örneğin, sütte bulunan bakteriler için süt tozu, deniz balıklarındaki bakteriler için deniz suyu ve bira analizlerinde bira besiyeri bileşiminde yer alır.

-İdentifikasyon amacıyla kullanılan bileşikler: İlgili bölümde (bknz ⇒ 06.03.05 tanımlama) amacıyla çeşitli kimyasalların besiyerleri bünyesinde yer aldığına değinilmiştir. Bunların dışında, pek çok kimyasal madde, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere besiyerlerinin bünyesinde yer almaktadır. Üre, KCN ve çeşitli aminoasitler (lisin, arjinin, ornithin vb.) tanımlama amacı ile besiyeri bileşimine giren maddelerin tipik örnekleridir.

-İnorganikler: Mikroorganizmalar beslenme için çeşitli inorganik maddelere de gerek duyar. Çeşitli makro ve iz (mikro) elementler, başta peptonlar ve ekstraktlar olmak üzere çeşitli besin maddelerinin bileşiminde yeterli miktarlarda bulunmakla birlikte bu maddeler bazı besiyerlerine mikrobiyel gelişmenin sağlanması için katılmaktadır.

04.05. Besiyeri Çeşitleri

Besiyerleri, birbirinden farklı mantıklar altında gruplandırılabilir. Örneğin besiyerleri, fiziksel özelliklerine göre sıvı ve katı olmak üzere iki gruba ayrılırken bir başka bakış açısı ile kaynağına göre bitkisel, hayvansal, sentetik, türev, karışık vb. şekillerde de sınıflandırılabilirler.

Besiyerlerinin kullanım amacına göre sınıflandırılması ise bir anlamda besiyeri bileşimi ile doğrudan ilgilidir ve sınıflandırmada en yaygın olarak kullanılan uygulamadır. Kullanım amacına göre sınıflandırılmalarında da farklı yaklaşımlar vardır. Kimi araştırıcı ve kullanıcıya göre belirli bir grupta yer alan bir besiyeri, diğerlerine göre başka bir grupta sınıflandırılmaktadır. Aşağıda, "kanlı agar" besiyeri bu konuda tipik bir örnek olarak verilmiştir.

Bu kitapta besiyerleri en çok kabul gören sınıflandırma şekli olan "kullanım amacına göre" gruplandırılmıştır. Bu sınıflama şeklinde besiyerleri öncelikle "genel besiyerleri" ve "özel besiyerleri" olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Özel besiyerleri ise kendi içinde farklı alt gruplar içinde değerlendirilir.

Bir yaklaşıma göre, genel besiyerleri dışında kalan tüm besiyerleri "özel besiyerleri" grubuna girer.

Basit bir örnekle CASO (tryptic soy) broth, genel bir sıvı besiyeridir. Buna agar ilavesi ile elde edilen CASO agar, genel bir katı besiyeridir. CASO broth ve/ veya CASO agara %8 NaCl eklenirse artık selektif (seçici) besiyerleri elde edilmiş olur ve bu besiyerlerinde sadece %8 NaCl derişiminde gelişebilecek olan *Staphylococcus aureus* gibi bakteriler gelişebilir. CASO Broth + %8 NaCl + ox bile + MUG gibi bir besiyeri formülü tümüyle yanlıştır. MUG, *E. coli* analizinde

kullanılır ancak *E. coli* %8 NaCl derişiminde gelişemez. Ox bile ise *Staph. aureus* gelişmesini baskılar.

Koliform grup bakterilerin tanımlanmasında kullanılan Simmons citrate agar ile *Pseudomonas* türlerinin ayrımında kullanılan acetamide broth besiyerlerinde tek karbon kaynağı olarak sırası ile sitrat ve asetamit bulunur. Buna göre bakteri bu karbon kaynağını kullanabiliyorsa gelişir ve bir pH indikatörü aracılığı ile besiyeri rengi değişir. Benzer durum, *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türlerinin analizinde kullanılan GSP (glutamate starch phenol red) agar için de geçerlidir. Bileşimdeki glutamat ve nişasta yegâne besin maddeleri olup pek çok refakatçi flora, bu maddeleri besin olarak kullanamaz.

04.05.01. Genel Besiyerleri

Herhangi bir inhibitör madde içermeyen, besin maddelerince yeterli veya zengin, herhangi bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak desteklemeyen ve bazı zor gelişenlerin de dâhil olduğu çok sayıda mikroorganizmanın gelişmesini sağlayan besiyerleridir.

Bu grupta değerlendirilen besiyerleri, genel olarak bakteriler için kullanılır. Bununla beraber bu besiyerlerinde maya ve küfler de gelişebilir. Benzer şekilde örneğin, *E. coli* fajları ile ilgili bir çalışmada da genel nitelikli bir besiyeri kullanılabilir.

Genel besiyerleri başlıca toplam mezofil aerop bakteri sayımı, toplam psikrofil aerop bakteri sayımı, bozulma ya da hastalık etmeninin ön izolasyonu gibi amaçlar için kullanılır. Buna göre;

-Başta gıda maddeleri olmak üzere pek çok numunede "toplam mezofil aerop koloni sayısı" ile "toplam psikrofil aerop koloni sayısı" önemli kalite kriterleridir. Toplam mezofil aerop koloni sayısından kasıt 28-30 ^{o}C'ta (kimi kaynaklara ve amaca göre 35-37 ^{o}C'ta) gelişebilen tüm kolonilerin sayısıdır.

-Günlük kullanımdaki bakterilerin aktifleştirilmesi, basit olarak korunması vb. amaçlarla da genel besiyerleri yaygın olarak kullanılır.

-Nedeni hakkında bir ön fikir edinilemeyen bozulma ya da hastalık etmeninin izolasyonu için de genel besiyeri kullanılır. Burada amaç, etmenin her ne olursa olsun öncelikle izole edilmesidir ve genel bir besiyeri kullanmak bir anlamda zorunludur. Etmenin zor gelişen bir mikroorganizma olabileceği varsayımı ile bu tip izolasyonlarda bunların gelişebileceği zenginleştirilmiş ya da brain heart agar gibi zaten zengin bileşimli besiyerleri kullanmak daha doğru olur.

Yeryüzündeki tüm bakterilerin geliştirilebileceği nitelikte bir genel besiyeri yoktur. Bunlar, zor gelişen bakterilerin sadece bir bölümünün gelişmesini sağlayabilir. Klinik mikrobiyolojide farklı gruplardaki zor gelişen bakteriler için genel besiyerlerine başta kan olmak üzere katkılar ilave edilerek zenginleştirmeler yapılmaktadır. Gıda mikrobiyolojisinde bu tip uygulamalara genellikle gerek duyulmaz.

Genel besiyerleri inkübasyon koşullarının değiştirilmesi ile psikrofillerin, termofillerin, mikroaerofillerin, aerotolerantların ve özel inkübasyon koşullarının sağlanması ile kısmen anaeropların analizinde de kullanılır.

Gıda mikrobiyolojisi açısından ele alındığında plate count agar, nutrient agar, nutrient broth, CASO (tryptic soy) agar ve CASO (tryptic soy) broth en sık kullanılan genel besiyerleri içinde yer alırlar.

Ayrıca brain heart (infusion) broth ve brain heart agar ile tamponlanmış peptonlu su da genel besiyeri olarak değerlendirilir. Kanlı agar ise basit bileşimli bir genel besiyerine kan ilavesi ile hazırlanır.

Kanlı agar üzerinde bir diğer yaklaşım, besiyerlerinin kullanım amacına göre farklı gruplarda değerlendirilebileceği görüşüdür. Kanlı agar, klinik mikrobiyolojide standart genel besiyerlerinde gelişemeyen "zor gelişen" bakterilerin izolasyonu için kullanıldığında "zenginleştirilmiş genel besiyeri" olarak değerlendirilir. Bu besiyeri, gıda mikrobiyolojisinde elde edilen bir izolatın hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi amacı ile kullanıldığında ise identifikasyon besiyeridir. Bir klinik örnekten sadece ß hemoliz yapan bakterilerin izolasyonu için kullanılıyorsa bu kez diferansiyel (ayırt edici) besiyeri olarak değerlendirilir.

04.05.02. Selektif Besiyerleri

Selektif (seçici) besiyerleri, çeşitli mikrobiyolojik analizlerde karışık bir mikrobiyel flora içinde gelişmesi istenmeyen mikroorganizmaları olabildiğince fazla baskılamak, ancak gelişmesi istenenler için tersine olarak minimum düzeyde olumsuz etki yapmak üzere formülize edilir. Bu amaçla genellikle çeşitli inhibitör maddeler kullanılır.

İnhibitörlerin derişimi, baskılanması hedeflenen mikroorganizmaların cins ve türlerine göre değişir. Buna göre selektif besiyerleri; zayıf, orta veya yüksek selektiviteli olarak gruplandırılırlar.

Yüksek selektivite gösteren besiyerleri, tek cins ya da familyada/ grupta mikroorganizma gelişmesine izin vermesi nedeniyle bu besiyerleri selektif izolasyon, selektif sayım ve hatta ön identifikasyon amaçları ile kullanılabilir. Ozmofil mayalar ve halofil bakterilerin analizi için geliştirilen besiyerleri bunların tipik örnekleridir. Gıda mikrobiyolojisinde sadece tek tür mikroorganizmanın gelişebileceği selektivitede besiyeri örneği bugün için yoktur.

Bir besiyerine selektivite kazandırılması, sadece inhibitör madde ilavesi ile yapılmaz. Geliştirilmesi istenilen mikroorganizmanın kullanabileceği, ancak refakatçi mikroflora tarafından kullanılamayan özel besin maddeleri besiyerinde karbon ve azot kaynağı olarak kullanılarak da selektivite sağlanabilir. Örneğin, gıda mikrobiyolojisinde *Pseudomonas* aranması için kullanılan GSP agar besiyerinde glutamat ve nişastadan başka besin maddesi yoktur.

Nişasta ve glutamat, *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türleri tarafından besin maddesi olarak kullanılırken gıda maddeleri, atık sular ve gıda endüstrisi

ekipmanlarında bu bakteriler ile birlikte bulunan refakatçi mikroflora, bu maddeleri metabolize edemedikleri için gelişemezler. Bu maddeleri çok kısıtlı olarak kullanabilenler, ihmal edilebilecek kadar küçük koloni oluştururlar.

Selektif besiyerinin bileşimine giren inhibitörlerin gelişmesi istenen mikroorganizmaya az da olsa bir miktar zarar verebilmesi, inhibitör kullanımı ile refakatçi flora inhibisyonunun her zaman mümkün olmaması, bazı inhibitörlerin insan sağlığına zararlı olması vb. nedenlerle her koşulda istenilen sonuç alınamayabilmektedir.

Yakın akraba türler arasında selektif madde kullanılarak inhibisyon etki sağlamak oldukça zordur. Örneğin koliform grup bakteriler, yakın akrabadır ve içlerinde herhangi birisini kimyasal inhibitör kullanarak baskılamak zordur. Ancak *E. coli* O157:H7 serotipi, sefiksime diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden çok daha dirençlidir. Ya da selektif inhibitörler ile birlikte yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı kombine olarak kullanılarak örneğin, fekal koliform grup bakteriler lehine bir selektif izolasyon/ sayım ortamı sağlanabilir.

Selektif besiyerlerinde geliştirilmesi hedeflenen mikroorganizmanın analiz sırasında hasarlı olup olmaması önemlidir. Hedef mikroorganizma hasar görmüş (stres altında) ise seçici özelliliği (selektivitesi) yüksek bir besiyerinde gelişip koloni oluşturamayabilir ve buna bağlı olarak sahte negatif sonuçlar alınabilir. Eğer analiz edilecek numunede hedef bakterinin hasar görmüş olmasından endişe ediliyorsa düşük seçici özellikteki besiyerleri tercih edilmedir, ancak bu koşulda refakatçi floranın baskın hale gelmesi mümkündür[5]. Selektif sıvı besiyerlerinin kullanıldığı analizlerde selektif olmayan önzenginleştirme ve canlandırma işlemleri ile bu sorunun giderilmesi daha kolay olmaktadır.

Mikrobiyolojide besiyeri olarak selektif ortamlar yerine diferansiyel besiyerlerinin hazırlanması ve kullanılması ile çoğu kez daha fazla tatmin edici sonuçlar alınmaktadır.

[5] Başta Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda verdiğim "Mikrobiyolojide Kullanılan Besiyerleri" yüksek lisans dersi olmak üzere pek çok seminerde de anlattığım mizansen şöyledir: Bu sınıfta kim(ler)in Urfalı olduğunu anlamak çok kolaydır. Bol acı biberli lahmacun yaparım, kim(ler) yiyebiliyorsa Urfalıdır. Ancak Urfalı olmadığı halde bol acı biberli lahmacun yiyenler de vardır. Bunları ayıklamak için acı biber derişimini artırmak basit bir çözümdür. Bu kez, tam tabiri ile yedi göbekten Urfalı bir kişi, o gün stres altında ise (ishal, grip vb.) bu kadar acı lahmacunu yiyemeyebilir ve ben o kişinin gerçek Urfalı olmadığına karar verebilirim. Bu, sahte negatif sonuçtur. Daha az acılı lahmacunu Urfalı olmayanlar da yiyebilir. Ben, bu kişilerin Urfalı olduğuna karar verebilirim. Bu, sahte pozitif sonuçtur. Kadir Halkman.

04.05.03. Diferansiyel (Ayırt Edici, Fark Ettirici) Besiyerleri

Diferansiyel besiyerlerinde gelişmesi istenen mikroorganizma yanında diğer mikroorganizmalar da gelişebilir. Ancak başta koloni morfolojisi olmak üzere çeşitli farklılıklar ile hedef mikroorganizma diğerlerinden ayrılır. Bu tanımlamaya göre, diferansiyel besiyerleri, zayıf ve orta güçte selektivite gösteren selektif besiyerlerinin modifikasyonu olarak nitelendirilebilir.

Ayırt edici koloni özelliği çeşitli kromojenik substratlar, pH indikatörleri, boya maddeleri, indirgeyiciler, diğer indikatörler vb. maddelerin besiyerine ilavesi ile elde edilir. Pek çok mikroorganizma, belirli bir karbohidratı kullanırken asit oluşturur ve bu asitlik pH indikatörü ile kolayca belirlenebilir. Ayrıca mikroorganizmanın jelatinaz, lipaz, lesitinaz vb. enzim aktiviteleri besiyerinde oluşan berrak zonlar ile belirlenebilir.

Bu besiyerleri sıvı ya da katı olabilir. Katı besiyerlerinde koloni elde edilmesi mümkündür, ancak sıvı besiyerinde sadece hedef mikroorganizmanın var ya da yok olduğu anlaşılır.

Örneğin koliform grup bakteriler için laktozdan gaz oluşturulması tipik bir ayırt edici özelliktir ve gaz oluşumu Durham tüpleri kullanılarak belirlenir. LST broth, BGB broth gibi selektif sıvı besiyerlerinde gaz görülen tüpte koliform grup bakteri olduğu kesindir. Diğer bazı bakteriler besiyerinde gaz oluşturmadan gelişebilir. Bu besiyerlerine MUG ilave edilip inkübasyondan sonra gaz görülen tüplerin uzun dalga boylu UV lamba ile kontrolünde floresan ışıma görülmesi *E. coli* olduğunu gösterir. *E. coli* O157:H7 serotipi MUG (floresan) negatiftir.

Yine koliform grup bakteriler için kullanılan VRB agarda koyu kırmızı renkli koloniler koliform bakterileri gösterir. Bu durumda VRB agar, koliform grup için seçici bir besiyeridir. Bu besiyerine MUG eklenmesi ile elde edilen Fluorocult VRB agarda Petri kutularının inkübasyon sonrası uzun dalga boylu UV lamba ile kontrolünde floresan ışıma görülmesi *E. coli* olduğunu gösterir. Bu durumda Fluorocult VRB agar, *E. coli* için ayırt edici (diferansiyel) seçici besiyeri iken diğer koliform grup bakteriler için sadece seçici besiyeridir.

Diferansiyel besiyerinde gelişen mikroorganizmaların ayrımı koloni morfolojisi, enzimatik aktivitelerin belirlenmesi, gaz oluşumunun izlenmesi vb. çıplak gözle yapılabileceği gibi floresansa dayalı olarak kolayca yapılabilmektedir.

Diferansiyel besiyerleri sadece selektif besiyerlerinin bir modifikasyonu değildir. Çeşitli genel besiyerlerine ilave edilen özel bazı katkılar bu besiyerlerine diferansiyel bir nitelik kazandırabilir.

Hemoliz reaksiyonlarında kullanılan kanlı agar besiyeri bunun en tipik örneğidir. EC brotha MUG ilave edilerek hazırlanan bir besiyerinde 44,5 ^{o}C'taki inkübasyon sonunda fekal koliform bakteriler yanında *E. coli* analizi de floresan testi ile beraberce (paralel olarak) yapılabilir.

Diferansiyel besiyerlerine verilebilecek en tipik örneklerden birisi de chromogenic coliform agardır (CCA). Bu besiyerinde laktoz pozitif olan tüm koliform grup bakteriler pembemsi kırmızı renkli koloni yapar. İçlerinde *E. coli*, ayrıca ß-D-Glucuronidase enzimi aracılığı ile bu besiyeri bileşimindeki X-Glucuronide substratını parçalar ve koyu mavi/ menekşe renk oluşur. Koyu mavi/ menekşe renk, pembemsi kırmızı rengi baskılar ve böylece *E. coli* kolonileri koyu mavi/ menekşe renkli görülür. ß-D-Glucuronidase enzimine sahip olmayan *E. coli* O157:H7 serotipi ise diğer koliform grup bakteriler gibi pembemsi kırmızı renkte koloni yapar. *Pseudomonas* spp. gibi laktoz negatif bakteriler, CCA besiyerinde renksiz koloni oluşturarak gelişirler.

Diferansiyel besiyerleri, amaca göre selektif izolasyon, selektif sayım ve ön identifikasyon amaçları ile kullanılmaktadır.

04.05.04. Zenginleştirme Besiyerleri

Karışık bir mikroflora içinde hedeflenen bir mikroorganizmayı geliştirmek, sayısını artırmak, hücrede olası hasarların giderilmesini sağlamak vb. amaçlarla kullanılan zenginleştirme besiyerleri ön zenginleştirme besiyerleri ve selektif zenginleştirme besiyerleri olarak iki alt grupta incelenir.

Ön zenginleştirme besiyerleri genel olarak hasar görmüş (yaralanmış, stres altında) mikroorganizmaların aktivitelerini kazanmaları için kullanılan, bileşiminde inhibitör içermeyen, dolayısı ile aktivite kazanması istenen mikroorganizma yanında refakatçi mikrofloranın da gelişmesine izin veren sıvı besiyerleridir. Buna göre "özel amaçla kullanılan genel besiyerleri" olarak da nitelendirilebilirler.

Bu besiyerlerine en tipik örnek, gıdalarda *Salmonella* aranmasına yönelik çalışmaların ilk aşaması olan ön zenginleştirmede kullanılan "tamponlanmış peptonlu su" besiyeridir. Bileşimi 10 g/L et peptonu, 5 g/L NaCl ve 10 g/L fosfat tampon olan bu besiyerinde, *Salmonella* yanında ortamdaki diğer bakteriler de kolaylıkla ve iyi bir şekilde gelişebilir.

Selektif zenginleştirme besiyerleri ise özel amaçla kullanılan selektif sıvı besiyerleridir. Bunlara en tipik örnekler *Listeria*, *Salmonella* vb. patojen bakterilerin aranmasında kullanılan besiyerleridir.

Selektif zenginleştirme aşamasında karışık kültür olarak bulunan bakterilerden gelişmesi istenmeyenler, çeşitli selektif inhibitörlerin kullanımı ile kısmen ya da tümüyle engellenir.

Selektif zenginleştirme aşamasını genellikle selektif bir katı besiyerine sürme yapılarak aranan bakterinin selektif izolasyonu aşaması izler. Buna göre selektif zenginleştirmenin amacı, selektif izolasyonda başarı şansını artırmak için aranan bakterinin karışık kültür içindeki sayısını artırmaktır.

Selektif zenginleştirme aşaması, her zaman ön zenginleştirme aşamasını izlemez. Hedef bakteri ve analiz edilecek numuneye göre doğrudan selektif

zenginleştirme ile de analize başlanabilir. Örneğin, *E. coli* O157:H7 analizi doğrudan selektif zenginleştirme ile başlarken *Listeria* analizinde yarı selektif zenginleştirme ve selektif zenginleştirme şeklinde bir uygulama vardır.

Klinik mikrobiyolojide ise *Salmonella* kuşkusu duyulan dışkı örneği, selektif zenginleştirme aşamasına alınmakta, hatta gerekirse bu aşama bile geçilip selektif katı besiyerine sürme yapılmaktadır. Bu uygulamanın nedeni, tüm zenginleştirme aşamalarının bağırsakta bitmiş olmasıdır. Diğer bir deyiş ile dışkıda yüksek sayıda aktif *Salmonella* varsa zenginleştirmeye gerek yoktur.

04.05.05. İdentifikasyon Besiyerleri

Selektif ve diferansiyel besiyerlerinin ön identifikasyonda kullanılabileceğine yukarıda değinilmiştir.

Yeterince selektif ve ayırt edici bir besiyerinde gelişen bir mikroorganizmanın identifikasyonu, cins ve hatta tür bazında tamamlanabilir. MUG içeren VRB agarda floresan veren koloni *E. coli* olarak değerlendirilir.

Bir mikroorganizma izolatının tanımlanması için halen en çok kullanılan testler, basit biyokimyasal nitelikli olanlardır. İdentifikasyon besiyerleri, izolatın belirli bir besin maddesini (örneğin, laktoz) kullanıp kullanmadığının saptanması, belirli bir besin maddesinden metabolizma sonunda tayin edilebilecek metabolitleri (örneğin, triptofandan indol) oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi vb. amaçlar ile kullanılır. Bakterinin hareketli olup olmadığının saptanması amacıyla kullanılan yarı katı besiyerleri de bu gruba dâhil edilmektedir. Bu amaçla yarı katı olarak nutrient agar gibi genel bir besiyeri ya da SIM medium gibi kombine bir besiyeri kullanılabilir.

04.05.06. Membran Filtrasyon Besiyerleri

Özellikle suların ve membrandan geçebilecek diğer sıvı ve gaz numunelerin mikrobiyolojik analizinde filtrasyon işleminden sonra membran filtrenin yerleştirileceği besiyerleri farklı şekillerde olabilmektedir:

-Laboratuvarda hazırlanmış ya da ticari olarak sağlanmış standart agarlı besiyerleri bu amaçla kullanılabilir. Bu tip besiyerleri araştırma amacıyla farklı ve modifiye besiyerleri denenmesinde kullanılabileceği gibi doğrudan doğruya ilgili laboratuvarın alışkanlıkları/ tercihi de olabilir. Agarlı hazır besiyerinin raf ömrü konusunda dikkatli olunmalıdır.

-Sıvı besiyeri, bir pede emdirilir, kurutulur ve sterilize edilir. Bu çeşit besiyerleri, steril bir Petri kutusu içinde pazarlanır. Kullanıcı, pedi steril su ile ıslatır ve besiyeri kullanıma hazır hale gelir. Islatılmamış haldeki pedin raf ömrü uzundur ve soğukta depolamaya gerek yoktur.

-Petri kutusu içinde steril boş pet vardır. Kullanıcı, pedi steril sıvı besiyeri ile ıslatarak kullanıma hazır hale getirir. Islatma için gereken sıvı besiyeri hazır ticari preparat olarak pazarlandığı gibi laboratuvarda da hazırlanabilir.

Ticari preparatlarda raf ömrü kısadır ve soğukta depolanmalıdır. Araştırma amacıyla laboratuvarda farklı bileşimlerde sıvı besiyerleri yapılabilir.

Hangi tip besiyerinin kullanılacağına her laboratuvar kendisi karar verir.

04.05.07. Kombine Besiyerleri

Bir besiyerinde birden çok mikrobiyolojik tanımlama testi aynı anda beraberce yapılabilir. Bunun en tipik örneği, *Salmonella* analizinde yaygın olarak kullanılan triple sugar iron agardır. Yatık agar olarak tüplerde hazırlanan bu besiyerinde tek ekim ile glikoz, laktoz ve sakkarozdan asit oluşturma, glikozdan gaz oluşturma ve H_2S oluşturma testleri yapılmaktadır. Bu gibi identifikasyon amaçlı ve birden çok test uygulananlar "kombine besiyeri" olarak adlandırılır.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında en çok kullanılan kombine besiyerleri aşağıda özetlenmiştir.

-Triple sugar iron (TSI) agar: Tüpte yatık agar olarak hazırlanır. *Salmonella* tanımlamasında öze ile yüzeye sürme ve aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır. İnkübasyon sonunda tek tüpte glikoz, sakkaroz ve laktoz kullanımı, H_2S ve gaz oluşturma test sonuçları alınır (bknz⇒ 06.04.03.16. bölüm)

-Kligler iron (double sugar iron) agar: Tüpte yatık agar olarak hazırlanır. Asıl olarak *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanmasında kullanılır. Öze ile yüzeye sürme ve aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır. İnkübasyon sonunda tek tüpte glikoz ve laktoz kullanımı, H_2S ve gaz oluşturma test sonuçları alınır.

-Sulfide indole motility (SIM) medium: Tüpte dik yumuşak agar olarak hazırlanan besiyerine aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır. İnkübasyon sonunda tek tüpte hareket ve H_2S oluşumu değerlendirildikten sonra Kovacs' ayıracı damlatılır ve tüp mekanik karıştırıcıda karıştırılarak indol test sonucu alınır.

-Lysine iron agar: Tüpte yatık agar olarak hazırlanır. Başta *Salmonella* olmak üzere *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlamasında kullanılır. Öze ile yüzeye sürme ve aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır. İnkübasyon sonunda tek tüpte lisin dekarboksilaz ve H_2S oluşturma test sonuçları alınır.

04.05.08. Diğer Besiyerleri

Agar disk difüzyonu ile yapılan antimikrobiyel duyarlılık ve minimal inhibisyon konsantrasyonu testleri, vitamin ve aminoasitlerin mikrobiyel yolla belirlenmesi, saf kültürlerin korunması (koleksiyonu) ve taşınması gibi özel amaçlara yönelik olarak kullanılan çeşitli besiyerleri de vardır.

Endüstriyel üretimde kullanılan besiyerleri ise oldukça farklı bir gruptur. Bunların dışında istenilen formülde "sipariş üzerine" üretilen besiyerleri de vardır. Bunlar, talebe göre dehidre, tüpte, kavanozda ya da Petri kutusuna dökülmüş şekilde hazırlanabilmektedir.

Taşıma besiyerleri, özellikle kültürlerin soğutmaya gerek olmadan basit bir şekilde taşınması ve hatta posta/ kargo ile başka bir laboratuvara iletilmesinde yaygın bir şekilde kullanılır. Besiyeri bileşimi zayıftır. Böylece mikroorganizma çoğalarak ölme fazına geçemez. Tersine olarak, besin maddesi yetersizliğine bağlı olarak da ölmez. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren mikroorganizmaların çok büyük bir bölümü kömürsüz Stuart taşıma besiyeri ile taşınabilir. Kömürlü taşıma besiyerleri, genellikle zor gelişen bakteriler için kullanılır.

04.06. Besiyerlerinin Hazırlanması

Laboratuvarlarda kullanılan pek çok besiyeri, dehidre formdan hazırlanır. Bu amaçla, gereken miktar dehidre besiyeri tartılıp üzerine damıtık su eklenir ve gerekli ise başka kaplara (örneğin tüplere) dağıtılıp sterilize edilir. Bazı besiyerlerinin formülden hazırlanması gerektiği gibi selektif besiyerlerinin bir kısmına sterilizasyon sonrasında çeşitli katkılar ilave edilir. Besiyerlerinin bir kısmı otoklavda, bir kısmı sadece kaynatılarak, bir kısmı basitçe ısıtılarak ve bir kısmı sadece membran filtrasyonla sterilize edilir.

Bir diğer deyiş ile kullanılan besiyerlerine göre değişmek üzere bunların hazırlanma şekillerinde kayda değer ölçüde farklar vardır. Hatta bazen aynı besiyerinin iki farklı ticari markası arasında bile hazırlanma farkı görülebilmektedir.

ISO gibi uluslararası bir kuruluşta kimi zaman bir besiyerinde bileşim ve/veya hazırlanış şekli değişikliği olabilmektedir. Bu nedenle aynı marka kullanılıyor olsa bile besiyeri ambalajı üzerindeki bilgiler her zaman çok dikkatlice okunmalıdır.

Her besiyeri kutusunda, kataloğunda ya da prospektüsünde, o besiyerinin nasıl hazırlanması gerektiği son derece basit ve 40-50 sözcükle, İngilizce olarak yazmaktadır.

Aşağıda (Çizelge 04.03.) besiyeri kutularında ve kataloglarında geçen bazı İngilizce sözcük ve terimlerin Türkçe karşılıkları gösterilmiştir. Bu kitabın gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren bölümlerinde değinilen besiyerlerinin büyük çoğunluğunun hazırlanma şekilleri ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 04.03. Besiyeri hazırlamada yaygın olarak kullanılan İngilizce sözcük ve terimlerin Türkçe karşılıkları

İNGİLİZCE	**TÜRKÇE**
About	Yaklaşık
Add	İlave edin
Autoclave	Otoklav, otoklavlayın
Autoclave under mild conditions	Düşük sıcaklık ve sürede otoklavlayın
Avoid	Sakının, yapmayın
Below	Altında, daha düşük
Blue	Mavi

İNGİLİZCE	TÜRKÇE
Boil	Kaynatın
Briefly	Yavaşça, hafifçe
Brown	Kahverengi
Caution	Uyarı, dikkat
Clear	Berrak
Completely	Komple, tümüyle
Cool	Soğutun
Dark	Koyu
Demin. water	Deiyonize (damıtık, saf) su
Dispense	Dağıtın
Dissolve	Eritin
Distilled water	Damıtık su
DO NOT ...	... Yapmayın
DO NOT AUTOCLAVE	(Besiyerini) otoklavda sterilize etmeyin
DO NOT OVER HEAT	(Besiyerini) fazla ısıtmayın
DO NOT REHEAT	(Besiyerini) tekrar ısıtmayın, eritmeyin
Filter–sterilize	Filtre ile sterilize edin
Filter–sterilized	Filtre ile sterilize edilmiş
Flask	Erlen
Frequent stirring	Sürekli çalkalayarak
Freshly	Taze, yeni hazırlanmış
Gently	Yavaşça, hafifçe
Green	Yeşil
Greenish	Yeşilimsi
Heat	Isıtın, ısıtmak
If	Eğer
Immediately	Derhal, hemen
Just before use	Kullanımdan hemen önce
Liquefy	Sıvılaştırmak, eritmek, eritin
Medium	Besiyeri
Melt	Eritmek, eritin
Min(ute)	Dakika
Mix	Karıştırın
Necessary	Gerekli
Over	Üzerinde, fazla
Pale	Soluk, mat
Plate(s)	Petri kutusu (kutuları)
Pour	(Petri kutularına) dökün
Prepared	Hazırlanmış
Prior	Öncesinde
Red	Kırmızı

İNGİLİZCE	TÜRKÇE
Reddish	Kırmızımsı
Refrigerator	Buzdolabı
Reheat	Yeniden ısıtmak, yeniden ısıtın
Reliquefy	Yeniden eritmek, yeniden eritin
Room temperature	Oda sıcaklığı
Selective supplement	Selektif katkı
Semi solid	Yarı katı
Shake	Sallamak, karıştırmak, sallayın, karıştırın
Slant (agar)	Yatık (agar)
Steam	Buhar
Store	Saklayın (depolayın)
Suitable	Uygun
Supplement	Katkı
Suspend	Çözün, eritin
Swarming	Yayılıcı
Swirl	Çalkalayın
Thick layer	Kalın tabaka
Thin layer	İnce tabaka
Thoroughly	Düzgün (tam) bir şekilde
Tube(s)	Tüp(ler)
Vial	Küçük şişe, şişecik
Vigorously	Sertçe, kuvvetlice
Water	Su
Well	İyice
White	Beyaz
Yellow	Sarı
Yellowish	Sarımsı

*Kaynak: www.mikrobiyoloji.org

Gerek kutu üzerinde yabancı dilde yazan hazırlama bilgileri hakkında gerek ilgili talimatlarda kuşkuya düşülür ise derhal bir üst yetkiliye danışılmalıdır.

04.06.01. Cam Malzeme

Besiyeri hazırlamada kullanılacak cam malzemenin çok iyi bir şekilde yıkanmış ve durulanmış, besiyeri hazırlamada kullanılan kalitedeki sudan geçirilmiş ve yeterince kurutulmuş olması gerekmektedir. Kırık ve çatlak cam malzeme kullanılmamalıdır. İçinde besiyerinin hazırlanacağı cam malzemenin yeterli büyüklükte olması çoğu kere ihmal edilen, ancak çok önemli bir ayrıntıdır. Cam kapların hacmi, mutlaka yeterli bir karıştırma sağlanacak ölçüde olmalıdır.

İdeal olarak, hazırlanacak besiyeri hacminin yaklaşık 2 katı hacimde cam kap kullanılmalıdır. Sıvı besiyerleri için besiyeri hacmi, cam kap hacminin en fazla 3/4'ü olabilir.

Cam kabın büyük tutulmasının nedeni, otoklavlama sırasında ısı geçişinin daha sağlıklı olması, otoklav sonrasında da rahat ve güvenilir çalışma sağlamasıdır. 1 litrelik bir erlende 1 litre besiyeri hazırlanırsa otoklavlama sırasında soğuk noktanın yeri nedeni ile ya soğuk nokta yeterince sterilize edilemeyecek ya da çepere yakın yerler gereğinden fazla ısıya maruz kalmış olacaktır.

Besiyerlerini hazırlamak amacıyla kullanılan her türlü cam malzemenin yüksek kalitede ve düşük alkaliborosilikat özellikte olması, otoklavda ve etüvde (kuru hava sterilizatörü) sterilizasyona dayanıklı olması gereklidir.

04.06.02.Tartım ve Eritme

Tartımın yapılacağı terazinin duyarlılığı, besiyerinin hazırlanış şekli ile doğrudan ilgilidir. Genel olarak günlük kullanımda 0,1 g duyarlılıktaki terazi kullanımı yeterlidir. Bileşimden gidilerek az miktarda hazırlanan besiyerlerinde bu duyarlılık yeterli olmaz ise seyreltme tekniği uygulanabilir ya da daha duyarlı bir terazi kullanılabilir. Besiyeri, düşük miktarda (~40-50 mL gibi) bileşimden hazırlanacaksa terazinin kalibrasyonuna özellikle önem verilmelidir.

Tartım için özel tartım kayıkçıkları ya da küçük beherler kullanılmalı, doğrudan erlen ya da balona tartımdan olabildiğince kaçınılmalıdır. Özellikle bileşimden hazırlamalarda tartım sırasında her madde için temiz spatül (kaşık) kullanılması, besiyeri ve/veya besiyeri bileşenleri kutularının kapakları açıldıktan sonra hata yapmamaya özen gösterilerek tartımın elden geldiğince çabuk bitirilmesi ve besiyeri kapağının sıkıca kapatılması gerekir. Tartım sırasında besiyeri ve/veya bileşenlerinin çok az da olsa toz bulutu oluşturmamasına özen gösterilmeli, eğer toz bulutu oluştu ise kesinlikle solunulmamalıdır. Besiyeri ya da katkıların bir kısmında zehirli kimyasallar vardır (bknz⇒ 04.11 Tehlikeli Maddeler bölümü). Devamında dehidre besiyerleri higroskopik özellikte olduğu için tozların solunması akciğerlerde sorunlara neden olur. Granül formdaki dehidre besiyerlerinde, tartım sırasında toz bulutu oluşması diğerlerine göre çok daha azdır ve dolayısıyla çalışan sağlığı açısından daha güvenlidir.

Tartım sırasında besiyeri ve/veya bileşenlerinin çıplak deriye ve özellikle göze temas etmemesi için gereken önlemler alınmalıdır. Eğer bir temas oluşmuşsa bol su ile ivedilikle yıkanması gerekir. Bu tip ayrıntılara NaCl, sakkaroz gibi günlük hayatta sürekli iç içe olunan maddelerin de dâhil edilmesi laboratuvar disiplini açısından son derece önemlidir. Tartım sonrasında oluşabilen toz bulutu, terazinin iç parçalarına girerek terazide fark edilemeyecek arızalara neden olur ve bunun sonucunda hatalı tartımlar yapılabilir. Bu nedenle tartım sonrasında terazi üzerinde toz oluşmuş ise yumuşak fırça ile temizlenmeli ve damıtık su ya da %70 etil alkol ile silinmelidir.

Besiyerine ilave edilecek su, ayrı bir ölçü silindirinde bulundurulmalıdır. Prensip olarak kullanılacak suyun hacmi ile silindirin hacmi birbirine yakın olmalıdır. Bir diğer deyiş ile 100 mL su ölçmek için 1 litrelik silindir kullanılmamalıdır.

Suyun yaklaşık 1/3'ü uygun bir kaba aktarılır, bunun üzerine tartılmış dehidre besiyeri ilave edilir. Bu uygulama ile cam kabın tabanına dehidre besiyerinin yapışarak erimemesine bağlı sterilizasyon yetersizliğinin önüne geçilir. Daha sonra suyun geri kalan kısmı cam kap boğazında ve iç çeperlerde kalmış olabilen besiyeri parçacıklarını yıkayarak besiyeri olan kaba ilave edilir.

Bazı sıvı besiyerleri, oda sıcaklığındaki suda kendi halinde 5-10 dk bırakılıp elle hafifçe bir çalkalama sonunda tümüyle eriyebilir. Bazı besiyerleri ise "broth" formunda olsalar bile eritilmeleri için mutlaka ısıtılmalarına gerek vardır. Agarlı besiyerleri hazırlandığı kapta otoklavlanacak olsa bile önce agarın erimesini sağlayacak şekilde ısıtılmalı, iyice karıştırılıp sonra otoklavlanmalıdır. Laboratuvar tipi mikrodalga fırınlar, agarın ısıtılarak eritilmesi amacına uygun olarak kullanılmaktadır. Ancak mikrodalga fırında ısı dağılımı düzgün olmadığı için erlendeki agarlı besiyerinin tamamı erimeyebilir. Bazı otoklavlarda bulunan agar eritme ayarı da bu amaçla kullanılır.

Besiyeri sıvı ise dehidre besiyeri ya da besiyeri bileşenleri tümüyle eridikten sonra daha küçük cam kaplara dağıtılır ya da doğrudan sterilize edilebilir.

Besiyeri bileşiminde agar varsa ve daha küçük hacimli kaplara dağıtılması gerekli ise besiyeri ısıtılıp agar tam olarak eritildikten sonra sürekli karıştırılarak 50-55 ^{o}C'ta su banyosunda tutulurken dağıtılması gereklidir. 60 ^{o}C üzerindeki agarlı besiyerinin 25 mL'lik pipetle tüplere dağıtılması sırasında eğer pipet ağızla çekilirse ağızda önemli yaralanmalara neden olabileceği unutulmamalıdır. Bu amaçla pipetör (pipet tabancası) kullanılmalıdır.

Özellikle agarlı besiyerlerinde otoklav öncesinde agarın mutlaka tam olarak eritilmesi için farklı uygulamalar söz konusudur. Bunlar arasında mikrodalga fırın, kaynar su banyosu ve ısıtıcı tabla yaygın olarak kullanılır.

-Mikrodalga fırın ani ısınmalara ve kaynamalara neden olabileceği için dikkatli kullanılması gerekir. Besiyerinin kaynadığının görülmesi, agarın eridiği anlamına gelmez. Isının tüm besiyeri kütlesine eşit olarak dağıtılmış olması gerekir. Ancak mikrodalga fırınlarda ısı dağılımı düzenli (yeknesak) değildir. Bu nedenle mikrodalga fırın kullanılarak eritme yapıldığında kaynamadan sonra erlen tercihen manyetik taş (balık) kullanılarak karıştırılmalı, erlen iç çeperinde agar ya da diğer besiyeri partiküllerinin kalmadığından emin olunmalı, endişe edilirse tekrar mikrodalga fırına konulmalı ve yeniden karıştırılmalıdır. Manyetik karıştırıcıda kullanılan manyetik taşın (balık) mikrodalga uygulaması sırasında erlenden çıkartılması önerilmektedir. Balık, %76'lık alkolde tutularak kolaylıkla sterilize edilebilir.

-Pek çok laboratuvarda asıl olarak "sıcak su banyosu" bulunur. Bunların ulaşacağı en yüksek sıcaklık 80 ^{o}C'tır ve buna bağlı olarak agarlı besiyeri eritilmesinde kullanılamazlar. Sıcak su banyolarının 80 ^{o}C'ta tutularak agarın

eritilmeye çalışılması, agarı eritmek için işe yaramayacağı gibi su banyosunun en yüksek verim ile çalışmaya zorlanması, zaman içinde arızalara neden olur. Besiyeri hazırlanan erleni/ kavanozu rahatça içine alacak ve su kaynatmaya uygun bir kap (örneğin, boş teneke konserve kutusu), bu amaçla kullanılabilir. Bu amaç için tercihen "benmari" şeklindeki kaynar su banyoları kullanılmalıdır.

-Isıtıcı tabla kullanılıyorsa manyetik karıştırıcılı olanlar tercih edilmelidir. Aksi halde, belirli aralıklarla elle karıştırma uygulanırsa erimemiş agar parçalarının erlen/ kavanoz iç çeperine yapışması ve otoklavlama sırasında yanma meydana gelebilir.

-Eritme amacıyla kullanılan ısıtıcı tablanın iş bitiminde kolaylıkla soğumadığı ve çeşitli laboratuvar kazalarına neden olduğu da unutulmamalı ve laboratuvar personeli bu konuda uyarılmalıdır.

-Erlen/ kavanoz amyant tabla üzerinde olsa bile açık alevde ısıtılarak besiyeri eritme yoluna gidilmemelidir.

Eritme sırasında erlenin/ kavanozun ağzı alüminyum folyo ile hafifçe kapatılarak buharlaşma ve buharın laboratuvara dağılması önlenmelidir. Eritme işleminin, başta agar olmak üzere bileşenlerin tam olarak eritilmesi amacıyla yapıldığı, günlük kullanılan besiyerlerinde en zor eriyen bileşenin agar olduğu ve agarın ~85 ^{o}C'ta eridiği bilinmeli ve devamında otoklav öncesi tüm bileşenlerin tam olarak eritilmiş olduğundan emin olunmalıdır.

Otoklavlama öncesi ısıtarak eritme, dikkatli yapılması gereken bir iştir. Sürekli karıştırılarak yapılmalıdır. Özellikle düşük miktarda agar içeren besiyerleri, eritme sırasında aniden kaynayarak kaptan taşabilir. Besiyeri hafifçe çalkalandığında erlen iç çeperinde partikül kalmaması, erimenin tam olarak gerçekleştiğini gösterir.

Besiyerine ilave edilecek su miktarı, çoğu kez hatalı ölçülür. Örneğin, besiyeri hazırlamada "dehidre hazır besiyerinden 23 g tartılıp 1 L saf suda çözülür" şeklindeki bildirişin anlamı, 23 g dehidre besiyeri üzerine toplam 1 L saf su ilave edilmesi demek değildir. "Dehidre hazır besiyerinden 23 g tartılıp 1 L saf suda çözülür" ifadesi şöyle okunmalıdır:

-Erlen/ kavanoz ya da balona önce 1 L saf su doldurulur,

-Cam yazar kalemle su düzeyi hassas bir şekilde işaretlenir,

-Suyun yarısından fazlası bir başka temiz kaba alınır,

-Besiyeri tartılır, tartılan kısım erlen/ kavanoz ya da balondaki su üzerine ilave edilir,

-İşaretli yere kadar saf su ilave edilir,

-Bu aşamada erlen/ kavanoz/ balon iç çeperinde kalmış olabilecek dehidre besiyeri parçacıklarının iç çeperden uzaklaştırılmasına/ yıkanmasına dikkat edilir, sonra tam eritme sağlanır. Isıtarak eritme sırasında su kaybı olabilir. Gerekirse işaretli yere kadar saf su eklenir.

Burada ilave edilecek toplam saf su hacmi 1 litreden daha az olacaktır. Az olan kısım dehidre besiyerinin hacmi kadardır. Pek çok ulusal ve uluslararası standart bu nedenle besiyeri hazırlanmasında "1 litre su ilave edilir." yerine "1 litreye saf su ile tamamlanır." şeklinde bir açıklama getirmiştir. Bu uygulama standart besiyerlerinin hazırlanmasında ihmal edilebilecek bir ayrıntı iken özellikle %50 glikoz broth gibi besiyerlerinin hazırlanmasında çok önemlidir.

04.06.03. pH Ayarlama

İster ticari olarak hazırlanmış dehidre besiyeri hazırlama katalogları ve prospektüslerinde ister bilimsel çalışmalara yönelik literatür bilgisinde olsun besiyeri pH'sından kasıt, sterilizasyon sonunda ve oda sıcaklığındaki (25 ^{o}C) pH'dır. Usulüne uygun olarak depolanmış ve raf ömrünü tamamlamamış ticari dehidre besiyerlerinde nötral su ve temiz cam malzeme kullanılması, besiyerinin doğru hazırlanması ve sterilizasyonun sulandırmadan sonra vakit geçirmeden yapılması ile besiyeri pH'sında bir sorun çıkmaz.

Besiyeri pH'sının sterilizasyon öncesi ayarlanması yanlış olur. Çünkü sterilizasyon sonrasında pH az da olsa değişir. Dolayısı ile besiyeri pH'sının sterilizasyon öncesinde ayarlanması, sterilizasyon sonrasında yanlış pH elde edilmesine yol açar.

Sterilizasyon sonrasında pH ayarlanması gerekli ise aseptik koşullarda alınacak belirli bir hacimdeki besiyerinde titrasyon ile pH ayarlaması yapılır. Sonra basit (doğru) orantı ile asıl kaptaki besiyerine ilave edilecek asit ya da alkali miktarı hesaplanır.

Aksine bir belirtme yoksa pH ayarlamasında filtre kullanılarak sterilize edilmiş olan 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılır. Sıvı besiyerinde pH ayarlaması, katı besiyerine göre çok daha kolaydır. Katı besiyerinde pH ölçüm ve ayarlama işleminin agarın jelleşme sıcaklığının üzerinde yapılması ve pH metre kullanılıyor ise sıcaklık düzeltmesine dikkat edilmesi gereklidir.

Tüpte hazırlanacak sıvı besiyerinde pH ayarlaması gerekli ise besiyeri erlende otoklavlanmalı, otoklav çıkışında pH ayarlanmalı ve sonra steril tüplere dağıtım yapılmalıdır. Bu amaçla besiyerinden 10 mL gibi küçük bir örnek alınır, pH'sı kontrol edilir, 0,01 N NaOH ya da 0,01 N HCl kullanılarak pH'nın istenilen değere gelmesi için gereken miktar belirlenir, sonra orantı ile asıl besiyerine daha derişik (1 N) asit ya da baz ilave edilir.

pH ayarlaması için pH kâğıdı da kullanılabilir. Bunun için ölçüm ve ayar yapılacak sınırları açıkça gösteren pH kâğıdı kullanılmalıdır. pH kâğıdı ile yapılan ölçümün çok duyarlı olmadığı, sadece "fikir vereceği" göz önünde tutulmalıdır.

Potato dextrose agar ve BAT agar örneklerinde olduğu gibi besiyeri pH'sı 5,5 altına ayarlanması gerekli ise asitlendirme sterilizasyon sonrasında yapılır. Agarlı besiyeri 5,5 altındaki pH'larda otoklavlanırsa yüksek sıcaklık ve yüksek

asitlik (düşük pH) nedeni ile agarın jelleşme yeteneği önemli ölçüde zarar görür/ ortadan kalkar[6].

Örneğin, potato dextrose agar otoklavlanıp 45 °C'a soğutulduğunda üzerine filtre ile sterilize edilmiş %10 tartarik asit çözeltisinden 14 mL/L olacak şekilde ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Bu işlem ile pH 5,6'dan 3,5'e düşürülmüş olur. Günlük uygulamada talimatta gösterildiği şekilde asit ilavesinden sonra pH kontrolüne gerek yoktur. Ancak ilgili talimata göre asit ilavesinden sonra pH kontrolü isteniyor ise buna tümüyle uyulmalıdır.

Yoğurtta *Lactobacillus bulgaricus* sayımı için pH'sı standart olarak 5,7 olan MRS agar yerine pH'sı asetik asit ile 5,4'e düşürülmüş MRS agar kullanılır. Her defasında pH ayarlamak yerine ilk olarak 100 mL MRS agar hazırlanır, steril çalışmaya dikkat etmeye gerek olmadan pH'sını 5,4'e düşürmek için gereken asetik asit miktarı ölçülür ve kayda alınır. Bu şekilde sadece 100 mL MRS agar, bu amaçla kullanılıp çöpe atılmış olur, ancak laboratuvar çalışmalarında büyük kolaylık sağlanır. Bu uygulamanın aynı besiyeri markası olsa bile her besiyeri kutusunda ve özellikle bu amaçla kullanılan asetik asit değiştirildiğinde önemli olduğu gözden uzak tutulmamalıdır.

Çeşitli bakterilerin tanımlama testleri içinde yer alan, "belirli bir pH'da gelişebilme" gibi analizlerde, besiyeri pH'sı tam olarak ayarlanmalıdır. Bu gibi analizlerde pH metre kalibrasyonunun son derece önemli olduğu açıktır.

Her ne kadar "Doğru depolanmış taze besiyeri ile taze hazırlanmış damıtık su kullanılıyor, tartım doğru yapılıyor ve kurallarına uygun olarak sterilizasyon yapılıyor ise besiyeri pH'sının her defasında kontrolüne gerek yoktur." şeklindeki görüş genel olarak geçerli olsa da;

-En azından ayda bir kez besiyerlerinde otoklav sonrasında kalibrasyonu yapılmış pH metre ile pH kontrolü yapılmalıdır.

-Gıda işletmelerinin iç standardında her otoklavlama işlemi sonrasında pH kontrolü varsa buna mutlaka uyulmalıdır. FDA gibi kimi uluslararası kuruluşların her otoklavlama sonrası besiyeri pH'sının ölçülmesi gerektiği kuralı gözden uzak tutulmamalıdır.

04.06.04. Katkıların İlavesi

Başta çeşitli antibiyotikler, vitaminler, kan ve yumurta sarısı olmak üzere besiyeri bileşimine giren bazı maddeler otoklavlama sırasında tahrip olur ya da yüksek sıcaklıkta bileşimdeki maddeler birbirleri ile çeşitli tepkimelere girer. Bunun en tipik örneği, asit-agar etkileşimidir. Bu gibi maddeler, otoklavlama sonrasında bazal besiyerine ilave edilir.

[6] pH ne kadar düşük ise agarın aynı yüksek sıcaklık uygulamasından olumsuz şekilde etkilenmesi o denli fazla olur.

Sıvı besiyeri için katkıların ilavesinde herhangi bir sorun yoktur. Besiyeri ve katkı maddeleri, otoklavlama sonrasında oda sıcaklığında aseptik koşullarda bazal besiyerine karıştırılır.

Agarlı besiyerlerinde ise katkı maddeleri agarın henüz sıvı formda kalabildiği yeterince düşük bir sıcaklıkta ilave edilir. Bu ilavede aşağıdaki hususlara dikkat edilmesi gerekir:

-Katkı maddesi asla soğuk olmamalı, oda sıcaklığında hatta 30-35 ºC'ta, agarlı besiyeri ise 45-50 ºC'ta tutulmalıdır. Böylelikle bazal (agarlı) besiyerlerinde katkının ilavesi ile ani soğumalar ve yerel jelleşmelerin oluşması önlenmiş olur. Bu nedenle, buzdolabında tutulan katkı maddesi doğrudan kullanılmaz.

-Katkı ilave edilecek agarlı (bazal) besiyeri içine sterilizasyon öncesi manyetik taş (balık) atılarak beraberce sterilize edilmesi, katkı ilavesinden sonra manyetik karıştırıcıda hafifçe karıştırarak katkının besiyeri içinde homojen olarak dağılması sağlanabilir. Bu işlemde anafor oluşturacak kadar hızlı yapılan karıştırma, ani soğumalara ve/veya besiyeri içinde hava kabarcığı oluşumuna neden olur. Anafor oluşturacak kadar hızlı karıştırmadan sonra Petri kutularına döküm ve jelleşme sonrasında hava kabarcıkları görülmüyor ise karıştırma işleminin, dolayısıyla katkı ilavesinin agarlı besiyeri çok sıcak iken yapıldığı anlaşılır.

-Sıvı besiyerine de sterilizasyon öncesi manyetik taş atılması yararlı olur. Numunenin homojenizasyonu amacıyla blender ya da stomacher kullanılacaksa katkısı eklenmiş sıvı besiyerinden manyetik taşın çıkartılması unutulmamalıdır.

-Katkı ilave edilmiş agarlı besiyeri, hızla Petri kutularına dökülmelidir. Aksi halde katkı yüksek sıcaklıktan olumsuz etkilenir ve sahte negatif sonuçlar alınabilir. Asit ilave edilmiş ise agarın jelleşme gücü zayıflar.

Başta antibiyotikler olmak üzere katkı maddelerinin büyük bir kısmı steril olarak pazarlanır. Yumurta sarısı içeren çözeltiler pastörize edilmiştir ve bunların steril olduğu kabul edilir. Asitler ve vitaminler ile bazı şekerlerin filtre ile sterilize edilmesi gerekir. Kan, sağlıklı hayvandan aseptik koşullar altında alındığı için steril olduğu kabul edilir.

Yumurta sarısı içerenler gibi bazı katkılar sıvı halde, antibiyotikler gibi bir kısmı ise küçük şişeciklerde[7] (vial) liyofilize formdadır. Bunlar, üzerlerine gereken miktarda steril damıtık su (bazen steril damıtık su ve alkol) ilavesinden ve tam olarak karıştırılmalarından sonra sterilize edilmiş besiyerine eklenirler.

Şişecikler içinde bulunan ve genellikle antibiyotik içeren selektif katkılar, şişecik içinde tablet gibi durur. Bunlar kırılmış gibi görülüyorsa sulandırılmaları sırasında toz oluşturmayacak şekilde dikkatlice su ilave edilmelidir. Bu katkılar, kendi halinde bırakıldığında genellikle birkaç dakika içinde çözülür. Dairesel ve yavaş hareketlerle çalkalama erimeyi kolaylaştırır. Çözündürme sırasında şişecik

[7] İngilizcede "vial" olan sözcük, bu kitapta şişecik olarak kullanılmıştır.

kapağına çözülmüş katkının bulaşmamasına özen gösterilmeli ve şişecik içeriğinin tam olarak çözülmüş olduğu kontrol edilmelidir.

Küçük şişeciklerde pazarlanan katkılar genellikle 500 ya da 1000 mL besiyeri için hazırlanmıştır. Buna göre bazal besiyeri hazırlanır, otoklavlanır ve soğutulduktan sonra üzerine katkı ilave edilir.

Katkılar, genel olarak belirli bir miktar besiyerinde bir kerede kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Örneğin, 50 mL yumurta sarısı tellurit emülsiyonu 1 L Baird-Parker agar hazırlanması içindir ve bu miktardan standart çaplı 80 Petri kutusu (12,5 mL/ Petri kutusu) hazırlanır. Pratik uygulamada bir şişe katkının tümünün bir defada kullanılması beklenmez.

Bu durumda katkıdan steril koşullara uyularak, gereken miktarın alınmasından sonra yine steril koşullara uyularak ağzının kapanmasına özen gösterilmelidir. Benzer şekilde sadece antibiyotik içeren katkıların da depolanması mümkündür (bknz⇒ 04.07.03. Katkıların Depolanması bölümü).

04.06.05. Petri Kutularına Döküm

Otoklavlama ya da daha geniş tarifi ile ısıl işlem ile sterilizasyon sonrası agarlı besiyerleri çoğunlukla Petri kutularına dökülerek kullanılır. Besiyeri dökülmeden önce homojenliğinden emin olmak için çalkalanmalıdır. Agarlı besiyerlerinin diğer kullanılış şekilleri arasında tüplerde yatık veya dik agar ile Roux şişelerinde kullanım sayılabilir. Bu diğer kullanım şekillerinde agarlı besiyeri genellikle anılan kaplarda sterilize edilir. Ancak agarlı besiyerlerinin cam Petri kutularında sterilize edilmesi uygulanan bir yöntem değildir. Agarlı besiyerleri, her zaman erlen gibi büyük kaplarda sterilize edilir ve sterilizasyon sonrası steril Petri kutularına aseptik koşularda dökülür. Bazı işletmelerde "el altında" bulundurma amacı ile eritilmiş agar tüplere dağıtılır, sterilize edilir ve bu şekilde korunur. Gerektiğinde eritilip Petri kutusuna aktarılır.

Petri kutularına dökülecek agarlı besiyeri miktarı, farklı kaynaklarda farklı değerler ile verilmektedir. Bu miktar, öncelikle Petri kutusu çapı ile ilgili olduğu için agarlı besiyeri döküldükten sonra besiyeri kalınlığının "en az 2-3 mm" olması yaygın olarak önerilmektedir. Bu kitapta önerilen standart dökme miktarı, günümüzde yaygın olarak kullanılan 9 cm çaplı steril tek kullanımlık plastik Petri kutuları için 12,5 mL/ Petri kutusu şeklindedir[8] (100 mL agarlı besiyerinin 8 Petri kutusuna dağıtılması; standart 9 cm çaplı Petri kutusunda

[8] 44 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda (örneğin termofilik aerop bakteri analizi, *Alicyclobacillus* analizi vb.) inkübasyonlarda ve özellikle inkübasyon süresi 24 saatten uzun olacaksa besiyerinin kuruma tehlikesine karşı Petri kutusuna dökülen agarlı besiyerinin standart 9 cm çaplı Petri kutularında ~20 mL olarak hazırlanması gerektiği çeşitli kaynaklarda uyarılmaktadır. Laboratuvar, bu konudaki uygulamayı laboratuvar dokümanı olarak kayda almalı ve kayda alınmış şekilde analiz yapmalıdır.

2 mm kalınlık). VRB agar besiyerinde dökme yöntemi ile yapılan kültürel sayımda 10 mL besiyeri dökülmesi, jelleştikten sonra üzerine 4-5 mL besiyeri ilavesi pek çok uluslararası standart tarafından önerilmektedir.

Agarlı besiyerinin otoklavlama sonrası Petri kutusuna hangi sıcaklıkta döküleceği konusunda pek çok yanlış uygulamaya rastlanmaktadır. Agarlı besiyeri için doğru uygulama şekli, otoklav sonrası besiyerinin ~45-50 ºC'a soğutulması ve bu sıcaklıkta Petri kutularına dökülmesidir.

Yüksek sıcaklıklarda dökme, Petri kutusunun kapağında aşırı miktarda su yoğunlaşmasına yol açar. Ayrıca yüzey kurutması daha uzun zaman alır.

Eğer Petri kutusunda "dökme yöntemi ile kültürel sayım" amacıyla önceden ilave edilmiş numune varsa dökme sıcaklığı 40 ºC'ı geçmemelidir. Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken bir diğer özellik, Petri kutusunda bulunan mikroorganizmaları olası termal şok zararından korumak için Petri kutularının oda sıcaklığında tutulması gerekliliğidir.

Herhangi bir nedenle otoklavlandıktan sonra 50 ºC'taki su banyosunda uzun süre kalması, agarın jelleşme özelliğinde kayıplara neden olur. 48 ºC'ta 4 saat beklemek izin verilebilecek en yüksek sıcaklık/ süre kombinasyonudur.

Besiyeri döküldükten sonra Petri kutuları yatay bir zeminde soğumaya ve katılaşmaya (jelleşmeye) bırakılır. Yayma yöntemi ile çalışılacak ise dökme sırasında besiyerinde oluşabilecek hava kabarcıkları, Bunsen beki alevi ile uzaklaştırılabilir. Ancak bu uygulamanın besiyerine kayda değer ölçüde zarar verebileceği ve dolayısıyla sahte negatif sonuç alınmasına yol açabileceği gözden uzak tutulmamalıdır[9].

Agarlı besiyerleri dökümden sonra bir süre depolanacaksa Petri kutularının tabanına döküm tarihi yazılmalıdır.

04.06.06. Kurutma

Petri kutularına dökülmüş agarlı besiyerlerinde yüzeyin ıslak olması istenmez. Islak yüzeylerde hareketli bakteriler yayılıcı tip koloni oluştururken hareketsizler olduklarından daha büyük koloni meydana getirir ve yanlış değerlendirmelere neden olur.

Tersine olarak aşırı kurumalar da olumsuz sonuç verir. Mikroorganizmalar, aşırı kurumuş bir besiyerinde normalinden daha küçük boyutta koloni oluşturacakları için yine hatalı değerlendirmelere neden olur.

Kurallara uygun olarak Petri kutularına dökümde yüzey hafif nemli olur. Öze ile sürme gibi bir çalışma yapılacaksa kurutma özellikle yapılmalıdır. Besiyerinin

[9] Sorun çıktığında bunu çözmeye çalışmak yerine sorun oluşmamasını sağlamak her koşulda en akılcı yoldur.

kurutma gerektirip gerektirmediği, basitçe yüzeyde su damlacıklarının görülmesi ile anlaşılır.

Dökümden sonra besiyeri yüzeyinin kurutulması gerektiğinde Şekil 04.05'te gösterildiği gibi iki farklı yöntem uygulanabilir.

a) Çabuk kurutma b) Güvenli kurutma

Şekil 04.05. Petri kutularının kurutulması

Petri kutularında agarlı besiyeri yüzeyinin çabuk kurutma yönteminde (a) kuruma hızlı olur, ancak kontaminasyon (bulaş) riski yüksektir. Diğer uygulamada (b) tersine olarak geç kuruma olur, ancak düşük kontaminasyon riski sağlar. Prensip olarak benimsenen uygulama güvenli kurutmadır. Çabuk kurutma sadece acil durumlarda uygulanmalıdır.

Kurutma, mutlaka temiz ve serbest hava akımı olmayan yerlerde yapılmalıdır. Steril hava akımı ile çalışan aşılama kabini (laminar air flow), sterilizasyon amacıyla kullanılan ve kurutma sırasında çalıştırılmayan etüvler (kuru hava sterilizasyon fırını) ve UV lamba ile sterilize edilen kabinler kurutma için kontaminasyon olmaması açısından en güvenilir yerler arasındadır. Kuru hava sterilizatörlerinde (Pastör fırını) kurutma sırasında sıcaklığın 50 ºC'ta tutulması hızlı bir kuruma sağlar. Bu uygulamada besiyerinin aşırı kuruma riski de vardır.

04.06.07. Yeniden Eritme

Sterilize edildikten sonra soğutulmuş ve jelleşmiş agarlı besiyerlerinin çeşitli nedenlerle yeniden eritilmesi gerekebilir. Burada akla gelen ilk iki neden, istem dışı olarak agarlı besiyerinin jelleşmesi ve besiyerinin her an kullanılabilecek şekilde elde hazır tutulmasıdır. Bazı ticari besiyerleri, vida kapaklı şişe içinde pazarlanır. Bunların eritilmesi zaten zorunludur.

Pek çok laboratuvarda agarlı olanlar da dâhil olmak üzere çeşitli besiyerleri sterilize edildikten sonra steril şekilde belirli bir süre depolanır. Bu uygulama, genellikle günlük kontrol yapan laboratuvarlarda örneğin, bir hafta boyunca kullanılacak besiyerlerini bir kerede hazırlamak amacıyla yapılır.

Katkı ilave edilmiş agarlı besiyerinin yeniden eritilmesi söz konusu değildir. Benzer şekilde yüksek sıcaklığa duyarlı olan besiyerleri için yeniden eritme önerilmez. Hatta bazı agarlı besiyerlerinin kullanma kılavuzlarında yeniden eritilmemesi gerektiğine özellikle dikkat çekilir. Düşük pH'lı besiyerlerini tekrar eritmekten kaçınılmalıdır, burada sınır olarak pH 6,0 verilmektedir.

Agarlı besiyerinin yeniden eritilmesi gerektiğinde, elden geldiği ölçüde az ısı girişinin sağlanması gerekir. Bu amaçla, kaynar su banyosunda yaklaşık 90 ºC'ta

tutularak erimenin tam olarak gerçekleştirilmesi yeterlidir. Standart sıcak su banyosu bu amaçla kullanılamaz.

Eritme amacıyla otoklav da kullanılabilir. Bazı otoklavların 90 ºC'a ayarlanması mümkün değildir. Bazılarında "eritme" seçeneği vardır. Otoklav bu amaçla kullanılacak ise asla sterilizasyon normunda değil, 102-103 ºC'ta 2-3 dakika süre ile ısıl işlem uygulanmalıdır. Burada, eritilecek besiyeri hacminin önemli olduğu açıktır. Büyük hacimlerde besiyerlerinin eritilebilmesi için doğal olarak daha yüksek sıcaklık ve/veya süreye gerek vardır.

Eritme amacıyla aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Basit bir şekilde, dairesel hareketlerle yapılan çalkalamada hava kabarcıkları merkeze toplanıyorsa besiyerinin tümüyle erimiş olduğu anlaşılır. Agarlı besiyerlerinin yeniden eritilmesinde mikrodalga fırınlar da kullanılmaktadır. Mikrodalga fırın kullanılması konusundaki endişeler 04.06.02. bölümde verilmiştir.

Agarlı besiyerlerinin otoklav sonrası tekrar eritilmesinde performans azalması olur. Bu azalma, besiyerinin bileşimi ile doğrudan ilgilidir. Ardışık olarak ikiden daha fazla eritmeler ile performans azalması kabul edilemeyecek düzeye çıkabilir. Bu nedenle prensip olarak agarlı besiyerinin sadece bir kez eritilmesine izin verilir.

Genel olarak plate count agar gibi basit bileşimli besiyerleri "yeniden eritme işleminde" daha az zarar görür. Besiyeri üreten ticari firmaların sadece eritilerek Petri kutularına dökülecek şekilde piyasaya sundukları Chromocult coliform agar gibi besiyerlerinin kalite güvencesi, bu firmalar tarafından garanti edilmektedir. Agarlı besiyerinin yeniden eritilmesi konusunda besiyeri üreten firmanın uyarıları varsa bunlara mutlak uyulmalıdır.

Yeniden eritilmiş agarlı besiyerinin en geç 3 saat içinde Petri kutularına dökülmüş olması gerekir. Laboratuvardaki iş akışı buna göre planlanmalıdır.

04.07. Depolama

Her dehidre besiyeri ve katkı kutusunun üzerinde depolama koşulları belirtilir. Genel olarak dehidre besiyerleri oda sıcaklığında nem almayacak şekilde, katkılar ise standart buzdolabı sıcaklığında (5±3 ºC) depolanır. Bununla beraber kutu üzerindeki uyarılara dikkat etmek ve bunlara tümüyle uymak gereklidir. Hazırlanmış besiyerlerinin depolanma kuralları daha farklıdır.

04.07.01. Dehidre Besiyerlerinin Depolanması

Kapağı açılmış besiyerleri ve/veya besiyeri bileşenleri kuru, karanlık ve serin bir yerde saklanmalıdır. Toz haldeki besiyeri ve bileşenleri için en büyük tehlike bunların nem almasıdır. Ambalaj kapağının ilk açılışından sonraki raf ömrü, saklama koşullarına doğrudan bağlıdır. Granül formdaki besiyerleri, toz formdakilere kıyasla olumsuz depolama koşullarından daha az etkilenir.

Kutu ilk açıldığı gün laboratuvar kayıt defterine ve kutu üzerine açılış tarihi kaydedilmeli, ilk açıldığında renk, topaklanma ve kalıplaşma belirtileri için görsel olarak kontrol edilmelidir.

Dehidre besiyerinin kalitesindeki kayıp toz akışında değişim, homojen yapı göstermeme, kalıplaşma, renk değişimi vb. farklılaşmalar ile anlaşılır. Nem almış ya da açıkça fiziksel değişim gösteren dehidre besiyerleri hiçbir koşulda mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

Salmonella-Shigella Agar besiyerinde şahit *Salmonella* kullanılarak yapılan bir çalışmada kontrol örneğine kıyasla geri alma oranları %1,1 nem almış besiyerinde %47 ve %5,5 nem almış olanda ise %22 olarak bulunmuştur.

Nemden korumanın en emin yolu, tartımdan sonra dehidre besiyeri kapaklarının sıkıca kapatılması ve bunların kuru bir yerde depolanmasıdır. Kutu açıldıktan sonra dehidre besiyerinin vida kapaklı renkli şişelere dağıtılıp ağızları sıkıca kapandıktan sonra kuru ve serin bir yerde tutulmaları raf ömrünü kayda değer ölçüde uzatır. Bu şekilde kullanım sırasında tüm besiyeri yerine sadece daha küçük bir ambalaj açılmış olur. Bu uygulama, yüksek nemli bölgelerde ve uzun süre depolanan besiyerleri için önerilir. Daha küçük kaplara dağıtımda dehidre besiyeri aşırı toz bulutu oluşturabilir ve bunun solunması zararlıdır. Bu işlemin çeker ocak sisteminde yapılması gerekir.

Kapağı açılmamış bir dehidre besiyerinin raf ömrü, genellikle 3-5 yıl kadardır. Ticari firmalar tarafından üretilen besiyerlerinin ambalajlarında son kullanım tarihi yazmaktadır. Ancak bu tarihin serin bir yerde depolanan ve kapağı açılmamış ambalaj ya da açıldıktan sonra doğru (serin ve kuru bir yerde, kutu ağzı sıkıca kapatılmış olarak) depolama yapılması koşulunda geçerli olduğu unutulmamalıdır.

Aksine ve net bir uyarı yoksa dehidre besiyerlerinin oda sıcaklığında (15-25 ^{o}C) depolanması yeterlidir. Bazı besiyerlerinin (örneğin MRS agar ve MRS broth) 15 ^{o}C altında saklanması gerekir. Ambalaj üzerindeki tüm bilgiler dikkatlice okunmalı ve uyarılara kesinlikle uyulmalıdır.

Genel olarak, dehidre besiyerlerinin buzdolabında saklanması önerilmez. Bunun nedeni buzdolabından çıkarıldıktan sonra kutu üzerindeki kondensasyon ve dehidre besiyerinin nem alma riskidir. MRS agar ve MRS broth gibi buzdolabında saklanması gereken besiyerleri, buzdolabından çıkartıldıktan sonra ambalajın dış yüzeyinde su damlacıkları görülürse ambalaj temiz bir kâğıt peçete ile silinmeli, besiyeri oda sıcaklığına geldikten sonra kapağı açılmalıdır.

Bu bilgiler ışığında, dehidre besiyerlerinin otoklav, yıkama odası, su banyosu ve kaynar su banyosu yakını gibi nemin yüksek olduğu yerlerde ve doğrudan güneş ışığı gören alanlarda depolanmaması gereği ortaya çıkar.

Burada verilen tüm bilgiler, dehidre haldeki besiyeri bileşenleri için de geçerlidir. Genel olarak inorganik bileşenler, organiklere kıyasla daha uzun süre ile depolanabilir.

04.07.02. Çözeltilerin Depolanması

Laboratuvarda hazırlanmış çözeltilerin pek çoğu, ışığa duyarsızdır ve soğukta saklanması gerekmez. Buna göre, tercihen cam çözelti şişelerinde ve oda sıcaklığında depolanabilirler.

Işığa duyarlı olan çözeltilerin amber renkli şişelerde depolanması gerekir. Benzer şekilde, bazı çözeltiler buzdolabında korunmalıdır. Bazı çözeltiler ise hazırlandığı gün kullanılmalıdır.

Çözeltilerde nem kaybı olması, derişim değişikliğine neden olacağı için bunların ağzı iyi kapatılan kaplarda depolanması gerekir. Alkol uçucu olduğu için ağzı açık kaplarda uzun süre beklerse derişimi düşer ve buna bağlı olarak dezenfeksiyon etkisi azalır.

Besiyeri hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin depolanmasında o çözelti için önerilen kurallara tam olarak uyulmalıdır. Aksi halde sahte negatif ya da sahte pozitif sonuç alınabilir.

04.07.03. Katkıların Depolanması

Aksine bir uyarı yoksa besiyeri katkıları 2-8 ºC'ta (5±3 ºC; standart buzdolabı sıcaklığı) depolanır. Çoğu katkı için ağzı açılmamış (ya da açıldıktan sonra sıkıca kapatılmış halde, soğuk ve kuru bir yerde) olmak kaydı ile depolama süresi 3-5 yıldır. Yumurta sarısı içeren katkılarda bu süre daha azdır.

Bazı katkılar, üzerlerine steril damıtık su ve/veya alkol eklenerek kullanıma hazır hale getirilir. Bunlardan bazılarının hazırlandıkları gün kullanılma zorunluluğu varken bazıları bir süre depolanabilir.

Sadece antibiyotik içeren katkılar, sulandırıldıktan sonra uygun küçük miktarlar halinde (örneğin steril Eppendorf tüplerinde) -18 ºC'ta dondurularak saklanabilir. Bu şekilde depolanmış olan çözeltiler, eritildikten sonra tekrar dondurulmamalıdır.

Bu konuda hayali bir örnek şu şekilde verilebilir: XYZ broth ya da agar bazal besiyerinin 500 mL'si için 1 şişecik liyofilize katkı, 1 mL steril saf su ile sulandırılıp otoklav sonrası 45 ºC'a soğutulmuş bazal besiyerine eklenmektedir. Laboratuvar günlük analizde bir defada 500 mL besiyeri hazırlıyorsa liyofilize katkıya eklenecek steril saf suyun tam olarak 1 mL olması gerekli değildir. Bu liyofilize katkıya çok yaklaşık 1 mL steril saf su ilavesinde sorun olmaz. Ancak laboratuvar günlük analizlerde her defasında 100 mL besiyeri hazırlıyorsa şu yöntem uygulanabilir:

-Liyofilize katkıya tam olarak 1000 µL steril saf su eklenir ve katkının tam olarak çözülmesi sağlanır.

-500 mL besiyeri için 1000 µL steril saf su ile çözülmüş liyofilize katkı kullanılacağına göre her 100 mL XYZ besiyeri için tam olarak 1000 µL steril su ile çözülmüş katkıdan 200 µL kullanılacağı hesaplanabilir.

-Tam olarak 1000 µL steril su ile çözülmüş liyofilize katkıdan kalibrasyonu yapılmış olan otomatik pipet ile tam olarak 200 µL alınıp 100 mL olarak hazırlanmış XYZ besiyerine eklenir.

-Geriye 800 µL çözelti kalmıştır.

-Kalibrasyonu yapılmış olan otomatik pipet ile tam olarak 200 µL alınıp steril Eppendorf tüplerine aktarılır.

-Geriye kalan son hacmin de tam olarak 200 µL olduğuna dikkat edilir.

-Bu şekilde 4 adet steril Eppendorf tüpüne dağıtılmış olan katkılar -18 ºC'ta derin dondurucuda saklanır.

-Sonraki 100 mL XYZ besiyeri hazırlamasında 1 adet Eppendorf tüpü içeriği oda sıcaklığında eritilir ve bazal besiyerine ilave edilir.

Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken 2 önemli husus şunlardır:

-Yukarıdaki örnekte verildiği gibi geriye kalan 800 µL katkının olduğu gibi dondurulması ve her kullanımda bunun tamamının çözülerek 200 µL alınıp kalanın tekrar dondurulması söz konusu değildir.

-Katkının uygun miktarlarda steril Eppendorf tüplerine dağıtılıp dondurulması ve her defa 1 Eppendorf tüpünün kullanılması, standartlarda geçen bir uygulama değildir. Bu uygulama sadece besiyeri üreten ticari firma teknik elemanlarının sözlü önerisidir.

Buna bağlı olarak ISO vb. standartlara uygun analiz yapan laboratuvarların bu uygulamayı kabul etmeden önce uygulamanın geçerliğinin kanıtlanması (verifikasyon) gerekir.

04.07.04. Hazırlanmış Besiyerlerinin Depolanması

Çoğu laboratuvarda besiyerleri hazırlandıktan sonra sterilize edilir ve daha sonra kullanılmak üzere depolanır. Bu uygulamaya çeşitli besiyeri katkıları da girer. Benzer şekilde Petri kutularında, vida kapaklı şişelerde vb. şekillerde kullanıma hazır halde besiyerleri sağlanabilmektedir.

Hazırlanmış besiyerlerinin stabilitesi sınırlıdır. Bunların depolanabilme süresi, öncelikle bileşimine ve saklama koşullarına bağlıdır. Her laboratuvar hazırlama, paketleme ve saklama koşullarına göre hazırlanmış her besiyeri için kendi depolama süresini belirlemeli, bu şekilde talimatlara geçirmelidir.

ISO 11133'e uygun olarak hazırlanmış besiyerleri, katkı ilave edilmemiş olmak kaydı ile standart buzdolabı sıcaklığında en çok 3 ay, oda sıcaklığında en çok 1 ay süre ile depolanabilir. Bununla birlikte bazı besiyerlerinin hazırlandığı gün kullanılma zorunluluğu vardır. Laboratuvar personeli bu konuda çok dikkatli olmalı ve kurallara tam olarak uymalıdır.

Hazırlanmış besiyerlerinin ne kadar süre ile depolanacağı, öncelikle besiyeri bileşimine, hangi ambalajda (tüp, vida kapaklı şişe, plastik Petri kutusu, cam Petri kutusu vb.) olduğuna ve depolama koşullarına bağlıdır.

Genel olarak, basit bileşime sahip ve katkı içermeyen besiyerleri, diğerlerine göre daha stabildir ve buna bağlı olarak daha kolay depolanabilirler.

Hazırlanmış besiyerlerinde raf ömrünü belirleyen en önemli faktörler, aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Işık

Hazırlanmış besiyerleri, peroksitler gibi bakterisit ve bakteriyostatik bileşiklerin oluşmasını önlemek için renkli şişelerde ya da doğrudan ışık almayacak şekilde depolanmalıdır. Standart depolamada ilave bir önleme gerek yoktur. Rose Bengal gibi bazı bileşenler, ışığa aşırı duyarlıdır. Dolayısı ile bu bileşeni içeren hazırlanmış bir besiyerinin bulunduğu Petri kutularının mutfak tipi alüminyum folyo ile sarılarak depolanması (hatta inkübasyonu) önerilir.

Nem

Dehidre besiyerinin nem alması ne denli istenmiyor ise hazırlanmış besiyerlerinde nem kaybından da o denli kaçınmak gerekir. Tüplerde, erlen ve balonlarda hazırlanmış besiyerlerinde nem kaybının önlenmesi kolaydır. Bu tip cam malzemede kap ağzının parafilm veya mutfak tipi strech film ile sarılması, nem kaybını önemli ölçüde önler.

Petri kutularında nem kaybını önlemek daha güçtür. Standart laboratuvar tüpünde hazırlanmış nutrient agar besiyeri ile sterilizasyondan sonra Petri kutularına dökülmüş nutrient agar arasında yüzey/ hacim oranı farklılığından kaynaklanan bir nem kaybı farklılığı vardır. Kuşkusuz, Petri kutusunda bulunan besiyerindeki nem kaybı tüptekinden çok daha fazla olacaktır.

Basit bir örnek olarak, depolama başlangıcında 5 mm olan agarlı besiyeri kalınlığı depolama sürecinde 4 mm'ye inerse bu durum çok yaklaşık olarak %20 nem kaybının göstergesidir. Besiyerinde ozmotik değişmeler olması yanında, özellikle selektif besiyerlerinde selektivite sağlayan bileşenlerin %20 derişim artışı, pek çok sahte negatif sonuca yol açar. Ayrıca kuruma, yüzey ve yüzeye yakın yerlerde çok daha fazla olur. Gram negatif bakterilerin besiyerindeki kurumaya bağlı olumsuzluklardan daha fazla etkilendiği bilinmektedir.

Petri kutularına dökülerek depolanacak agarlı besiyerlerinde nem kaybının önüne geçilmesi için Petri kutularını vakum altında depolamak önerilebilir.

Bu konuda, ev mutfaklarında çeşitli gıdaların vakum altında tutulması için üretilmiş basit makinelerden ve bunların özel torbalarından yararlanılabilir. Bu olanak yoksa Petri kutularının mutfak tipi strech film ile sarılarak depolanması basit, ancak raf ömrünü kayda değer ölçüde uzatan bir uygulamadır.

Genel olarak plastik Petri kutularında kapakların tam olarak kapanmasına bağlı olarak cam olanlara göre daha az nem kaybı olur.

Depolanacak Petri kutularında, yüzey kurutması yapılmamalıdır. Eğer kullanım öncesinde yüzeyde bir ıslaklık görülürse kurutma bu aşamada yapılmalıdır.

Sıcaklık

Hazırlanmış besiyerleri, elden geldiği ölçüde serin ortamlarda tutulmalıdır. Ancak özellikle agarlı besiyerlerinin dondurulmasından kesinlikle kaçınılması gerekir. Dondurma işlemi, agarın jelleşme özelliğine önemli ölçüde zarar verir.

Bileşimine bağlı olmak üzere hazırlanmış besiyerleri için değişik depolama sıcaklıkları önerilmektedir. Hazırlanmış besiyerlerinin standart buzdolaplarının çok soğuk olmayan orta ve alt bölmelerinde depolanması yaygın ve doğru bir uygulamadır. Aksine bir uyarı yoksa hazırlanmış besiyerleri serin bir ortamda, karanlıkta ve nem kaybetmeyecek şekilde depolanmalıdır. Kan, yumurta sarısı, yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu veya antibiyotik ilave edilmiş besiyerleri ise 2-8 ^{o}C'ta depolanmalıdır. Rambach agar gibi bazı besiyerleri için en düşük depolama sıcaklığı 6 ^{o}C'dır. Fraser broth gibi bazı besiyerlerinin katkının ilave edildiği gün kullanılması gerektiği unutulmamalıdır.

04.08. Çözeltilerin Hazırlanması

Mikrobiyoloji laboratuvarında en çok kullanılan çözeltiler, seyreltme (dilüsyon) amaçlı olanlardır. Bunlar genel olarak 90 ve 9 mL hacimde hazırlanır. Çiğ süt numunelerinde doğrudan 100 misli seyreltme için bu çözeltiler 99 mL olarak da hazırlanabilir. 99 mL olarak hazırlanan çözeltiler istenirse 1 mL numune ilavesi ile 1:100, istenirse 11 mL numune ilavesi ile 1:10 seyreltme için kullanılabilir. Burada 99+11= 110; 11/110= 1/10 seyreltme anlamındadır.

Seyreltme kavanozunda (erlende), 90 (ya da 99) mL olarak hazırlanan sıvı hacmi, sterilizasyondan sonra oda sıcaklığında kontrol edilir. Bu amaçla her 25 şişeden biri "A sınıf" dereceli silindir ya da eşdeğeri ile kontrol edilir.

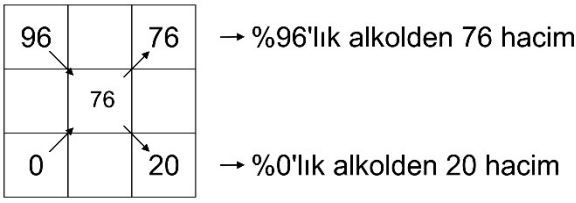
İzin verilen sapma hacmi ±%2'dir. Daha fazla sapma olursa nedeni araştırılıp düzeltici uygulama yapılmalı ve kayda geçilmelidir. Hacim değişikliklerinin temel nedenleri arasında otoklavın yanlış kullanılması da vardır.

Laboratuvarda hazırlanarak kullanılan diğer çözeltiler arasında alkol, asitler, bazlar ve boyalar vardır. Alkol, dezenfektan olarak %76 (v/v) konsantrasyonda kullanılır. Genellikle %96 konsantrasyonda pazarlanır. Buna göre, 4 hacim alkol üzerine 1 hacim damıtık su eklendiğinde çok yaklaşık olarak bu değer elde edilir.

Derişik çözeltilerden daha seyreltik olanların hazırlanmasında Pearson karesi (Şekil 04.06) ile hesaplama yapılır. Pearson karesi, % (dolayısıyla ppm gibi) ifade edilen çözeltiler için kullanılır. Aşağıda basit bir örnekle derişik olandan daha seyreltiğin hazırlanması verilmiştir:

-%96'lık alkolden damıtık su ile %76'lık alkol hazırlanması için sol üst köşeye 96, sol alt köşeye 0 (sudaki alkol derişimi) ve karenin merkezine 76 (hedeflenen derişim) yazılır. Köşegenler boyunca fark alınarak elde edilen mutlak değer (aşağıdaki örnekte 0 - 76= –76 değil sadece (76) diğer köşelere yazılır. Buna göre;

96 -76= 20 sağ alt köşeye,
0 -76= 76 sağ üst köşeye
yazılarak kare tamamlanır. Sonra karenin alt ve üst kenarları boyunca okuma yapılır: %96 derişimdeki alkolden 76 kısım ve %0 derişimli alkolden (damıtık su) 20 kısım karıştırıldığında %76'lık alkol elde edilir.



Şekil 04.06. Pearson karesi örneği

-Mikrobiyoloji laboratuvarlarında pH ayarlamak amacıyla genellikle 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılır. "Normal" çözeltilerin hazırlanmasında önce molekül ağırlığı hesaplanır. Molekül ağırlığı, bileşikteki atom ağırlıkları toplamıdır.

-NaOH için molekül (mol) ağırlığı; Na: 23; O: 16; H: 1 olmak üzere 40'tır.

-1 litre damıtık su içinde 40 g NaOH çözülmesi ile elde edilen çözelti, 1 Molar (M) olarak tanımlanır. Molekül ağırlığının tesir değerine bölünmesi ve çıkan değerin 1 litre suda çözülmesi ile 1 Normal (N) çözelti elde edilir. NaOH için tesir (etki) değeri 1 olduğuna göre 40 g/L çözelti aynı zamanda 1 Normaldir.

-Yukarıda besiyerlerinin formülden hazırlanması bölümünde örneği verilmiş olan $MgSO_4$'ın mol ağırlığı 108 g ve tesir değerliği 2'dir. Buna göre 108 g/L çözelti 1 M, 54 g/L çözelti 1 N'dir.

-Asitlerden yapılan hesaplamalarda derişim de dikkate alınır. Örneğin, 1 N (1 M) HCl hazırlamak için son konsantrasyon 36,5 g/L olacak şekilde damıtık su üzerine asit ilave edilir (hiçbir koşulda asit üzerine su ilave edilmez). Burada dikkat edilecek konu HCl'in NaOH gibi katı ve saf olmadığıdır.

-Buna göre, standart derişik (%38) HCl asitten 80,1 mL alınıp en az 0,5 L damıtık suya ilave edilir ve sonra damıtık su ile litreye tamamlanır. Bu şekilde hazırlanmış çözeltide 36,5 g/L saf HCl bulunur.

-pH metre elektrotunun korunduğu 3 Mol KCl için 223,5 g KCl bir miktar saf suda çözdürülüp saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

-Çözeltinin hazırlandığı tarih, bileşimi ve gerekli görülen diğer bilgiler, şişe üzerinde açıkça belirtilmeli ve etiket üzerindeki yazıların silinmemesi sağlanmalıdır.

-Sterilize edilmiş çözeltilerin kontamine edilmemesine özen gösterilmeli, kuşku duyulursa bu çözeltiler asla kullanılmamalıdır.

£Çözeltiler konusunda ayrıntılı bilgi www.kimyaevi.org sitesinden sağlanabilir.

04.09. Besiyeri Kalite Kontrolü

Besiyeri üreten firmalar ürettikleri ve pazarladıkları dehidre besiyerleri, hazır besiyerleri ve katkılarını sistematik olarak kalite kontrolden geçirmektedirler. ISO 11133 sayılı standart, üretici firmanın yükümlülüklerini belirlemektedir.

Dehidre besiyerleri, bileşenleri ve katkılarını kullanan laboratuvarlarda ilave kontrol uygulamalarına genellikle gerek duyulmaz. Buna karşın özellikle kuşku duyulmayı gerektirecek bir durumla karşılaşıldığında, aşağıdaki kontrollerin kullanıcılar tarafından yapılması yararlı olacaktır:

-Önce orijinal ambalajın fiziksel olarak zarar görüp görmemiş olduğu kontrol edilir. Kapak açıldıktan sonra renkte anormallik ve topaklaşma gibi kontroller yapılır. Renkte anormallik ve topaklaşma görülen besiyerleri kullanılmaz.

-Laboratuvarda sık kullanılan dehidre besiyerleri için halen kullanılmakta olan kutudan son parti besiyeri hazırlanırken yeni kutunun da açılması, bu kutudan da yeteri miktarda besiyeri hazırlanması ve ekimlerin her iki grup besiyerinde beraberce (paralel) yapılması ile bir anlamda yeni kutu için kalite kontrol yapılmış olur. Her iki grupta istatistiksel olarak analiz yapılmak üzere birbirlerinden farksız sonuç alınması gerekir.

-Aynı uygulama, besiyeri katkıları için de yapılmalıdır.

-Besiyeri üreten firmalar tarafından hazırlanan kataloglarda hangi besiyerinde hangi mikroorganizmaların nasıl gelişeceği "kalite kontrol mikroorganizmaları" adı altında gösterilir. Bu mikroorganizmaları besiyeri üreten ve/veya pazarlayan firmalardan sağlamanın maliyeti çok yüksek olabilir. Laboratuvarda sürekli analizi yapılan mikroorganizmaların basit bir koleksiyonu 06.07. Kültür Koleksiyonu bölümde ve otokontrol içerikli çalışmalar 06.06. Laboratuvarda Otokontrol bölümünde anlatılmıştır.

-Besiyerinde kullanıcı tarafından çözülemeyen bir hata kaynağı varsa öncelikle besiyerini pazarlayan firmayla temas kurulmalıdır.

04.10. Besiyeri Hataları

Besiyerlerinde doğrudan analiz sonucuna yansıyabilecek çeşitli hatalar ile bunların olası nedenleri aşağıda listelenmiştir. Aşağıda görüleceği gibi nem almış ve/veya yanlış tartılmış ve/veya aşırı ısıtılmış ve/veya hazırlamasında damıtık su kullanılmamış besiyerlerinde pek çok hata görülmektedir. Bu gibi hatalar gösteren ya da hatalı olduğundan kuşku duyulan besiyerleri mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

-Dehidre besiyerinde topaklaşma: Depolamada aşırı nem, dehidre besiyeri kutu kapağının nemli bir ortamda uzun süre açık kalması ve/veya gevşek kapatılmış olması, besiyerinin çok eski olması.

-Yanlış pH: Nötral olmayan su kullanımı, aşırı ısıtma, dehidre besiyerinin çok eski olması, yanlış tartım, pH'nın yanlış sıcaklıkta ölçülmesi, pH metre kalibrasyon hatası, sulandırmadan sonra sterilizasyonun zamanında yapılmaması, yetersiz yıkanmış cam malzeme kullanılması, dehidre besiyerinin nem alması.

-Anormal renk: Saf olmayan su kullanımı, kirli cam malzeme, yanlış pH, aşırı ısıtma, hatalı tartım, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Besiyerinde kararma: Aşırı ısıtma, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Bulanıklık ve presipitasyon (çökelti oluşumu): Saf olmayan suyun kullanılması, temiz olmayan cam malzemenin kullanılması, hatalı pH, aşırı ısıtma, bileşimden hazırlanmış besiyerlerinde temel bileşenlerin yeterli saflıkta olmaması, hazırlanmış besiyerinde depolama sırasında nem kaybı, dehidre besiyerinin çok eski olması, hazırlanmış besiyerinin +2 ^{o}C ve altında (ya da Rambach agar gibi bazı besiyerlerinin +6 ^{o}C altında) depolanması, sıvı besiyerinin tam erime sağlanmadan otoklavlanması. Kimi besiyerlerinde presipitasyon doğal bir sonuçtur ve besiyeri performansını etkilemez. Bu gibi durumlar ilgili besiyeri kataloğunda açıkça belirtilmektedir (örneğin Salmosyst brothta $CaCO_3$ kaynaklı açık bir çökelti normaldir).

-Yüksek sıcaklıkta jelleşme: Hatalı tartım, uygun olmayan agar kullanılması.

-Zayıf jelleşme stabilitesi: Hatalı tartım, dehidre besiyerinin tam çözülmeden dağıtılmış olması, düşük pH, asidin besiyeri çok sıcakken ilave edilmesi, aşırı ısıtma, besiyerini erimiş halde uzun süre ile su banyosunda bekletme.

-Zayıf gelişme: Yetersiz yıkanmış ve/veya durulanmamış cam malzemeden inhibitör madde bulaşması, hatalı pH, besiyeri ve katkılarının hatalı tartımı ve/ veya hatalı ilavesi, besiyerinin aşırı ısıtılması (otoklavda ya da kaynatarak), dehidre besiyeri raf ömrünün dolmuş olması, dehidre besiyerinin nem almış olması, hatalı inkübasyon sıcaklığı, yetersiz inkübasyon süresi, agarlı besiyerinin aşırı kurumuş olması, *Cl. perfringens* ve *Campy. jejuni* örneklerinde[10] olduğu gibi sırası ile aerotolerant ve mikroaerofilik (kapneik) özelliklerin gözden kaçırılmış olması.

-Refakatçi florada aşırı gelişme: Selektif inhibitörlerin bozulacağı kadar aşırı ısıtma veya selektif katkıların yüksek sıcaklıkta bazal besiyerine ilavesi, selektif inhibitörlerin eksik tartımı/ ilavesi, inhibitör içeren besiyerlerinde standart dışı uzun süre depolama (özellikle antibiyotik eklenmiş besiyerlerinde antibiyotiğin

[10] *Cl. perfringens*, aerotolerant bir bakteridir ve aerop koşullarda iyi bir gelişme gösteremez. Petri kutusuna ekimden sonra 2. kat agarlı besiyeri ilavesi ile bu bakterinin gelişebileceği basit ve yeterli bir anaerop ortam sağlanabilir. *Campy. jejuni* analizinde ise ön zenginleştirme aşamasında vida kapaklı kavanozun tam ya da tama yakın olarak doldurulması ile yeterli bir mikroaerofilik ortam sağlanır, ancak Petri kutularının inkübasyonunda mutlaka mikroaerofilik ortam sağlayan kitler kullanılmalıdır.

refakatçi flora üzerinde baskılayıcı etkisinin azalması/ ortadan kalkması), yanlış inkübasyon sıcaklığı/ süresi.

-Kolonilerin yayılması: Besiyeri yüzeyinin çok ıslak olması, selektif inhibitörlerin bozulacağı kadar yüksek sıcaklıkta katkı ilavesi.

-Atipik gelişme: Besiyerinin hatalı hazırlanması, dehidre besiyerinin çok eski olması, hazırlanmış besiyerinin uygun olmayan koşullarda ve/veya uzun süreli depolanması, cam malzeme ve/veya sudan çeşitli inhibitörler ve/veya yabancı maddelerin bulaşması.

04.11. Tehlikeli Maddeler

Dehidre besiyerleri; safra tuzları, asit, selenit, boyalar vb. zehirli maddeler ile toz gibi zararlı maddeler içerir. Toz besiyerleri kullanıldığında tartım sırasında yayılan tozu solumamak için önlem alınması önerilir. Tehlikeli maddelerin başlıca soluma, deri ile temas, göz ile temas ve yutma yolu ile çalışanlar için hastalık oluşturma riski vardır. Bunların bir kısmı vücuda bulaştığı anda etkisini gösterir, bir kısmının etkisi ise vücuttaki birikmeye bağlı olarak çok uzun süre sonra görülür.

Ayrıca bazı besiyeri bileşenlerinin çevre açısından kirlilik oluşturduğu da dikkate alınmalı, buna göre besiyeri ve bileşenlerinin çöpe atılmasında gereken özen gösterilmelidir.

Bazı besiyerlerinin bileşiminde insan sağlığı açısından tehlikeli maddeler bulunur. Bu maddelerden bir kısmı, sadece bu maddelere duyarlı kişiler için önemli olur iken talyum gibi bazı kimyasallar ile çalışılırken özel önlem alınması gerekir. Aşağıda insan sağlığı için tehlikeli olan kimyasallara örnekler verilmiştir:

-Barbitone: "Narkotik" grupta değerlendirilir. Bileşimden hazırlanan bazı besiyerlerinde kullanılır.

-Bile salts (ox bile; safra tuzları): Mukoz membranları tahriş eder. Koliform grup bakteriler için kullanılan bazı besiyerlerinde bulunur.

-Brilliant green: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Koliform grup bakteriler için kullanılan bazı besiyerlerinde bulunur.

-Cetrimide: Yutulması zararlıdır. Göz ve deride tahriş yapar. Başta Cetrimide agar olmak üzere Gram pozitif bakterilerin inhibisyonu için bazı *Pseudomonas* besiyerlerinde bulunur.

-Chloramphenicol: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Genel bakteri inhibitörü olarak DRBC agar ve RBC agar gibi bazı maya-küf besiyerleri bileşiminde bulunur.

-Crystal violet: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Gram pozitiflerin baskılanması için başta VRB agar olmak üzere bazı koliform grup bakteri besiyerleri bileşiminde bulunur.

-Cycloheximide: Selektif katkı olarak bulunduğu derişim tehlikelidir. Ancak besiyerine ilave edildiğinde derişimi tehlikeli olabilecek düzeyin altına iner. Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Bazı *Listeria* besiyerlerinde bulunur.

-Deoxycholate: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Salmonella* ve koliform grup bakteriler için hazırlanmış bazı besiyerlerinin bünyesinde bulunur.

-Kanamycin: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Fekal streptokoklar ve *Cl. perfringens* için hazırlanmış bazı besiyerlerinin bünyesinde bulunur.

-Lithium chloride: Yutulması zararlıdır, kusma ve ishale neden olur. Solunum sisteminde mukoza irritasyonu ile öksürüğe, deride tahrişe ve göze bulaşması halinde irritasyona yol açar. Toksik dozda alınması koşulunda görme bozukluğu ve kalp ritim bozukluğuna neden olur. Baird-Parker agar ve Fraser broth gibi bazı besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

-Malachite green: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Gram pozitifleri baskılar. Özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella* için hazırlanmış bazı besiyerlerinin bileşiminde bulunur.

-Nalidixic acid: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Pse. aeruginosa* ve *Listeria* analizinde kullanılan bazı besiyerlerinin bileşiminde bulunur.

-Potassium tellurite: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Staphylococcus* için hazırlanan besiyerlerinin çoğunda ve *E. coli* O157:H7 için kullanılan CT-SMAC agar besiyeri katkısında bulunur. Nutrient brotha %0,05 oranında katılarak *Listeria monocytogenes* zenginleştirmesinde kullanılabilir.

-Sodium azide: Dehidre besiyerlerinde az miktarda bulunmakla beraber bazı kişilerde aşırı duyarlılık görülebilir. Sodyum azit, başta bakır olmak üzere metaller ile temas ettiğinde patlayıcı metal azitleri oluşturur. Bu nedenle sodyum azit içeren besiyerleri, yıkama sırasında önce bol su ile muamele edilmelidir. Sodyum azit, asitlerle temas ettiğinde toksik gaz oluşturur. Enterokoklar için hazırlanan besiyerlerinin bazılarında bulunur. %1'den yüksek derişimler ile çalışılırken gereken önlem alınmalıdır (örneğin, çeker ocak).

-Sodium selenite: Solunması ile bronşiyal spazmlara, boğulma ve zatürre semptomlarına yol açar. Sindirilmesiyle bulantı, solgunluk ve mide şikâyetleri oluşur. Karaciğer, böbrekler ve merkezi sinir sistemine zarar verir, alerjiye neden olabilir. Çözeltisi, deri ve gözde tahriş yapar. Kümülatif etki riski vardır. Teratojenik potansiyeli nedeniyle doğurgan yaşta kadınlar bu madde ile çalışmaları sırasında çok dikkatli olmalıdır. Selenite cystine broth gibi bazı *Salmonella* besiyerlerinde yer alır.

-Sodium metabisulphite: Asit ile temasında toksik bir gaz olan sodyum dioksit oluşur. Bu gaz solunum sistemi ve deriyi tahriş eder. *Campylobacter* analizinde kullanılan Bolton selective enrichment broth (base) bileşiminde bulunur.

-Sodium thioglycollate: Solunması ve yutulması toksik etki yapar ve ayrıca deriyi tahriş eder. Anaeroplar için kullanılan bazı besiyerlerinin bileşiminde bulunur.

-Thallium salts (talyum tuzları): Solunması veya sindirilmesi toksik etki yapar. Kümülatif etki riski vardır. Bileşimden hazırlanan bazı besiyerlerinde bulunur.

04.12. Substrat Formülasyonu

Substrat içerisinde mikroorganizmanın gelişmesini, biyosentez ve diğer faaliyetlerin en iyi olmasını sağlayacak gerekli besin maddeleri bulunmalıdır. Gereksinim duyulan besin maddelerini yeterli miktarda ve uygun formlarda içeren bir substrat, başarılı bir üretim için ilk adımdır. Substratın kimyasal bileşimi hücre ve ürün sentezi için elementel gereksinimlerin tümünü karşılamasının yanı sıra, hücre muhafazası ve metabolik faaliyetler için gerekli enerjiyi de sağlamalıdır.

Buradan da anlaşılacağı gibi mikrobiyel aktivite için iki önemli beslenme faktörü vardır:

-Hücre metabolizması için gerekli enerji kaynakları,

-Hücreyi oluşturan ve ürünlerin biyosentezi için gerekli olan madde kaynakları.

Mikroorganizmalar, gereksinimleri olan enerjiyi ortamda bulunan çeşitli bileşiklerin kimyasal bağlarındaki depolanmış enerjiden sağlarlar. Bunlar organik veya inorganik maddeler olabilir. En iyi enerji kaynakları, karbohidratlardır.

İkinci beslenme faktörü ise biyokütle oluşumu ve biyosentez için gerekli olan C, H, O, N, P, S gibi ana elementler ve iz elementlerdir. Bunlar, substrat içinde basit bileşikler halinde bulunabileceği gibi kompleks bileşikler halinde de bulunabilirler.

Substrat bileşimi, özel amaçlara göre farklı olarak düzenlenir. Örneğin, gelişme besiyeri mikroorganizmanın aktif gelişmesini sağlayacak bileşimde, buna karşılık muhafaza besiyeri gelişme için uygun olmayan koşullarda ve yalnızca mikroorganizmanın canlılığını korumak için hazırlanır. Biyokütle üretimi amacıyla hazırlanan substratlarda karbon kaynağının derişimi düşük fakat metabolik ürün sentezi için kullanılacak substratlarda daha yüksek tutulur.

Besiyerleri, kullanılan hammaddenin türüne bağlı olarak genelde iki grup altında toplanır. Tam olarak bilinen miktarlarda ve saf maddeler kullanılarak hazırlanan besiyerlerine "yapay besiyeri" adı verilir. Kimyasal yapıları tam olarak belirlenmeyen kan, et özütleri, melas, pamuk çekirdeği, mısır unu, soya unu, malt çimi, peyniraltı suyu vb. doğal maddelerle hazırlanan besiyerlerine "kompleks" veya "doğal besiyeri" denir.

Yapay besiyerleri, çok genel olarak araştırma amacıyla kullanılır. Bunlar araştırıcıya aynı koşullarda çalışmayı yineleme olanağı, saydamlık, az köpürme ve ürünün kolaylıkla saflaştırılması gibi avantajlar sağlar. Bilimsel açıdan birçok yararları olmasına karşın bu tip besiyerlerinde elde edilen ürün verimi genellikle düşüktür ve daha önemlisi maliyet yüksektir. Bu nedenle endüstriyel

fermantasyonlarda çoğunlukla doğal besiyerleri kullanılır. Bununla birlikte endüstriyel fermantasyonların ilk kademelerini oluşturan laboratuvar aşamasındaki besiyerlerinde daha çok saf maddeler tercih edilir.

04.12.01. Substrat İçinde Bulunan Temel Bileşenler

Substrat içinde bulunan bileşenler temel işlevlerine göre karbon ve azot kaynakları, inorganik bileşikler ve vitaminler olarak gruplandırılır.

Karbon kaynakları

Karbon kaynaklarının başında karbohidratlar gelir. Biyokütlenin yaklaşık %50 C içermesi nedeniyle karbohidratlar besiyerlerinde diğer besin maddelerinden daha yüksek derişimlerde bulunurlar ve çok iyi bir oksijen, hidrojen ve metabolik enerji kaynağıdırlar.

Bazı karbon kaynakları gelişmeyi artırırlar, fakat bunun yanı sıra biyosentez hızı yavaşlar. Karbohidratların mikroorganizmalar tarafından metabolize edilme kolaylığı, heksozlardan polisakkaritlere doğru gidildikçe azalır. Böyle durumlarda, gelişmeyi artıran karbohidrat ile birlikte biyosentez hızını artırıcı etki gösteren karbohidrat da ortamda bulunmalıdır.

En önemli karbohidrat kaynakları glikoz, sakkaroz, melas, mısır, buğday, patates, pirinç, arpa, yulaf nişastaları ve unlarıdır. Melas, karbohidrat kaynağı olmasının yanı sıra azot, inorganik bileşikler ve vitaminleri de içerdiğinden ucuz ve iyi bir hammaddedir.

Bunların dışında hidrokarbonlar, yağlar, alkoller, selüloz ve türevleri de mikroorganizmaların cinslerine göre substrat içerisinde karbohidrat kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Azot kaynakları

Hücre yapısında karbon ve oksijenden sonra en fazla bulunan element, azottur. Azot kaynakları inorganik veya organik olabilir. Çoğu mikroorganizma moleküler azotu, nitratları, nitritleri ve amonyağı azot kaynağı olarak kullanabilir. Amonyak, aynı zamanda fermantasyon pH'sını istenen düzeyde tutma amacı ile de kullanılabilir.

Mikroorganizmaların büyük çoğunluğu, organik azot kullanırlar. Organik azot kullanımı hücrenin gelişme hızını artırır. Bunların fazla kullanımı, olumlu etki gösterebileceği gibi üretim verimini de düşürebilir.

Organik azot kaynaklarının başlıcaları aminoasitler, pürinler, pirimidinler, üre, bitkisel ve hayvansal proteinlerdir. Bu proteinler, gıda ve tarım endüstrisinin yan ürünleri olup saf azotlu bileşiklerden daha ucuz olmalarının yanı sıra hücre gelişmesi için gerekli olan vitaminleri, çeşitli mineralleri ve çeşitli büyüme faktörlerini de içerirler.

Substratta bulunan azot kaynağının hücre tarafından kolayca kullanılabilir olması dikkate alınmalıdır. Örneğin proteinler, yalnızca hücre dışı proteazlar salgılayarak proteinleri enzimatik olarak aminoasitlere hidrolize edebilen mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir. Bu enzim sistemine sahip olmayan mikroorganizmanın protein hidrolizatlarına, peptonlara veya proteinli maddeleri asit veya enzimlerle hidroliz etmek suretiyle hazırlanmış ve serbest aminoasitleri içeren azotlu maddelere gereksinimleri vardır.

İnorganik bileşenler

Biyokütlenin ortalama %5-10'u küldür. Külün büyük bölümünü fosfor (%60) ve kükürt (%20) oluşturur. Ayrıca K, Mg, Na, Ca, Fe, Mn, Mo, Co, Zn, Cl gibi elementler bulunur. Fosfor en fazla şeker fosfatları kükürt ise en çok sistin ve methionin aminoasitlerinde bulunur. Diğer elementler çoğunlukla enzimlerle kompleks halde bulunur.

Mikroorganizmaların mineral gereksinimlerini tam olarak bilmek her zaman gerekli değildir. Çünkü endüstriyel karbon ve azot kaynaklarının çoğu hatta şehir suyu dahi yeterli miktarda mineral içerebilir. Bazen bu maddeleri azot, fosfat ve sülfatlarla, nadiren de Mg ile takviye etmek gerekebilir.

Vitaminler

Koenzim veya koenzimlerin bileşikleri olan vitaminlerin hücre içerisinde önemli katalitik fonksiyonları vardır ve metabolizma için gereklidir. En sık gereksinme duyulan vitaminler tiamin, biotin, niasin, pantotenat ve riboflavindir.

Vitaminler, endüstriyel fermantasyonlarda kullanılan karbon ve azot kaynaklarının içinde çoğunlukla yeterli miktarda bulunurlar. Bu nedenle ayrıca substrata ilave edilmeleri gerekmez.

Diğer katkı maddeleri

Bütün bunların dışında substrata çeşitli amaçlara yönelik katkı maddeleri ilave edilebilir:

-Aşırı gelişmeyi yavaşlatan (misel artış hızını yavaşlatan), metabolik ürünün biyosentez hızını artıran maddeler (inhibitör). Örneğin, antibiyotik fermantasyonlarında bu amaçla benzil-tiyosiyanat kullanılmaktadır.

-Biyosentez kademelerinde tepkimeye giren ve ürün verimini artıran maddeler (prekürsörler). Örneğin, klortetrasiklin fermantasyonunda ortama tuz ilavesi, penisilin G fermantasyonunda fenilalanin ve fenilasetik asit ilavesi.

-Fermantasyon pH'sını istenen düzeyde tutmak için ilave edilen asit, baz veya tampon karakterinde maddeler.

-Köpürmeyi azaltıcı yüzey aktif maddeler (bitkisel ve hayvansal yağlar, silikonlar vb).

04.12.02. Hücre Bileşimi

Hücre bileşimi ile ilgili detaylı elementel analizler burada belirtilmeyecek, fakat kullanılacak değerler substrat formülasyonunda bir rehber niteliğinde olacaktır. Bir mikroorganizma hücresinin tipik elementel bileşimi, Çizelge 04.04'te görülmektedir. Mikrobiyel gelişme için kullanılacak herhangi bir ortam, en azından bu elementleri uygun oranda içermelidir.

Çizelge 04.04. Mikroorganizmaların tipik elementel bileşimi

Element	Hücre kuru ağırlığına göre %
Karbon	50
Azot	7-12
Fosfor	1-3
Kükürt	0,5-1,0
Magnezyum	0,5

Karbon, oksijen ve hidrojen hariç olmak üzere substrat içerisindeki besinlerin formülasyonu için çizelge 04.04'teki veriler esas alınır. Örneğin, azot ve kükürt kaynağı olarak amonyum sülfat kullanılarak 30 g/L maya hücresi kitlesinin sentezi hedefleniyorsa 12 g/L $(NH_4)_2SO_4$'ın ortamda bulunması gereklidir. Bu miktardaki $(NH_4)_2SO_4$, 2,4 g/L azot ve 3,0 g/L kükürt sağlayacaktır. Azot gereksiniminin temin edilmesi ile kükürt gereksiniminin fazlaca karşılanabileceği görülmektedir.

Benzer bir hesaplama, 30 g/L hücre biyokütlesinin sentezi için Çizelge 04.05'te görülen minimal ortamın düzenlenmesine olanak verir.

Çizelge 04.05. Seçilmiş bir karbon kaynağından 30 g/L maya üretimi için düzenlenmiş bir gelişme ortamı

Ortam Bileşenleri	Derişim (g/L)
Karbon enerji kaynağı	
Metanol	60,0
Etanol	40,0
Glikoz	60,0
$(NH_4)_2SO_4$	12,0
KH_2PO_4	1,3
$MgSO_4$	1,5
İz elementler	
(Cu, Co, Fe, Ca, Zn, Mo, Mn)	10^{-4}M

Biyokimyasal kofaktörler veya yapısal komponentler olarak iz elementlere de gereksinim duyulmaktadır. Fakat bu elementlere olan gereksinimi tahmin etmek çok zordur. Buna rağmen bir kural olarak, Çizelge 04.05'te görülen iz elementler 30 g/L hücre için 10^{-4}M ve 3 g/L hücre için 10^{-5}M derişimlerinde ilave edilebilirler. Bazı mikroorganizmaların bir veya daha fazla iz elemente normalden daha fazla ihtiyaç duyabileceği unutulmamalıdır.

04.12.03. Özel Biyokimyasal Gereksinimler

Birçok mikroorganizma basit mineral tuzları içeren ortamlarda iyi gelişebilirse de bazıları bir veya daha fazla özel biyokimyasal bileşiklere gereksinim duyar. Bu durum, bazı mikroorganizmaların gereksinim duydukları tüm biyokimyasal bileşikleri kendilerinin sentezleyememesinden kaynaklanmaktadır. En fazla gereksinim duyulanlar vitaminler ve aminoasitlerdir. Örneğin, mayalar çoğunlukla biotin, tiamin ve riboflavine gereksinim duyarlar. Bazı mikroorganizmalar oldukça müşkülpesenttir ve 10-12 tane biyokimyasal komponentin besiyerine ilavesi gerekir. Genellikle vitaminlere olan gereksinim az miktardadır ve bunlar tipik olarak litreye "mg" düzeyinde ilave edilirler.

04.12.04. Enerji Gereksinimleri

Mikroorganizmalar temel kimyasal maddeleri kompleks moleküllere çevirirlerken bu tepkime serilerini gerçekleştirebilmek için enerji kullanmaya gereksinim duyarlar. Bu enerji çoğunlukla indirgenen organik bileşiklerin kontrollü oksidasyonu ile temin edilir. Bu tür karbon bileşikleri, hücrelerin elementel karbon gereksinimlerini karşılamalarının yanı sıra biyosentez enerjisi üretmek amacıyla da kullanılırlar. Biyosenteze ilave olarak hücre yapısının muhafazası, moleküllerin aktif taşınması (transportu), hücre ile çevresi arasındaki derişim değişimlerini dengelemek ve bazen hücre hareketi için de enerjiye gereksinim duyulur.

Bu nedenlerle besiyeri ortamında tüm bu gereksinimleri karşılayacak yeterli miktarda karbon kaynağı bulunmalıdır. Hücre gelişmesi için karbon kaynağı gereksiniminin hesaplanması, hedeflenen hücre yoğunluğunun beklenen hücre verimine ($Y_{x/s}$) bölünmesi ile yapılır. Örneğin, verim 0,5 g hücre/g glikoz olduğu zaman glikozdan 30 g/L hücre elde etmek için Çizelge 04.05'te görüldüğü gibi 60 g/L glikoza gereksinim duyulur.

Temel besinlerden biri olan oksijen, suda zor çözünen bir gaz olduğundan fermantasyonda özel bir kitle transferi sorunu getirir. Bununla birlikte oksijen gereksiniminin mikroorganizmaya, karbon kaynağına ve kullanımındaki etkinliğe bağlı olduğu söylenebilir.

04.12.05. Endüstriyel Substrat Seçimi ve Formülasyondaki Genel İlkeler

Belirli bir üretime yönelik substrat seçimi için kesin bir yöntem yoktur, bu daha çok bir uzmanlık işidir. Deneysel ve teorik çalışmalar birlikte yürütülerek en verimli ve ekonomik substrat seçilir. Bu nedenle bu bilgiler, çoğunlukla endüstriyel bir sır olarak saklanır.

Substrat formüle edilirken aşağıdaki hususlara özellikle dikkat edilmelidir:

-Substrat, hücre gelişmesi ve biyosentez için gerekli besin maddelerini mikroorganizmaların yararlanabileceği uygun bileşikler halinde içermelidir. Eksik olanlar takviye edilmelidir.

-Endüstriyel substrat formülasyonları hazırlanırken yöresel hammaddenin seçimi ve üretimde kullanılması büyük önem taşır. Belirli bir substrat içinde çok iyi gelişen bir suş, aynı hammaddenin başka bir yöreden temin edilmesi durumunda gelişmeyebilir. Bu durum hammaddenin üretiminde yöresel koşullara bağlı farklılıklardan kaynaklanabilir. Bu farklılıkların kimyasal analizler ile tespit edilmesi zor olduğundan en iyisi mikroorganizmanın yöresel hammaddeye uyumunun (adaptasyonunun) sağlanmasıdır.

-Hammaddenin kimyasal kalite kontrol analizlerinin yanı sıra küçük çapta üretim denemeleri ile biyolojik yönden uygunluğu denenmelidir.

-Hammaddedeki gereksiz fazlalıkların, olumsuz sonuçlara neden olabileceği dikkate alınmalıdır.

-Substrat formülasyonları saptanırken hammaddeler ile ilgili birim ve taşıma maliyeti, depolama süresi ve koşulları ile korozyon gibi ekonomik faktörler göz önünde tutulmalıdır.

-Hammadde içindeki toksik özellikteki maddeler, substrattan uzaklaştırılmaya çalışılmalıdır.

Hatırlatma:

Her sıvı besiyerine (broth), agar eklenerek o besiyeri agarlı hale getirilemez. Örneğin CASO brotha formüldeki kadar agar eklenirse CASO agar elde edilemez. CASO broth + agar ile CASO agar bileşimi farklıdır. Acil durumlarda bu gibi uygulamalar çözüm olabilir, ancak bilimsel bir araştırmada böylesi bir uygulama makalenin reddine neden olabilir.

Dolayısı ile bilimsel çalışmalarda orijinal besiyeri kullanılmalıdır. Benzer durum ISO vb. uluslararası kurallara uygun analiz yapan kamu kontrol laboratuvarları ve özel sektör laboratuvarları için de geçerlidir.

Hatırlatma:

ENDO agar besiyerinde floresan ışımaya bağlı olarak *E. coli* belirlenmesi söz konusu değildir. Çünkü ENDO agar besiyerinde MUG substratı yoktur. Metalik yeşil röfle (yansıma) ile floresan ışıma çok farklıdır. Üstelik ENDO agar besiyerinde aynı metalik yeşil röfle, fuchsin kaynaklı olarak *E. coli* dışındaki koliform grup bakteriler tarafından da oluşturulur.

05. STERİLİZASYON

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

05.01. Genel Bilgiler **131**
05.02. Nemli Sıcak Uygulaması **134**
05.02.01. Otoklavda Sterilizasyon 135
05.02.02. Kaynatarak-Isıtarak Sterilizasyon 139
05.02.03. Tindalizasyon 141
05.02.04. Düdüklü Tencere Uygulaması 141
05.02.05. Diş Hekimlerinin Kullandığı Otoklav 141
05.03. Kuru Sıcak Uygulaması **142**
05.04. Membran Filtrasyon **142**
05.05. Kimyasal Madde ile Sterilizasyon **143**
05.06. Işınlama ile Sterilizasyon **144**
05.07. Sterilizasyon Kontrolü **146**
05.08. Sterilize Edilmeyen Çözeltiler **147**
05.09. D, z ve F Değerleri **147**
05.10. Besiyerinin Kısmî Sterilizasyonu **152**

05.01. Genel Bilgiler

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında elde edilen sonuçların güvenilir olması için belirli çalışma kurallarına eksiksiz uyulması gerekir. Bunların en önemlilerinden birisi de kullanılan malzemenin steril olmasıdır.

Analizde kullanılan ve numune ile doğrudan temas eden her türlü malzeme steril olmazsa bunlardan gelebilecek mikroorganizmalar, gıdadan gelmiş gibi değerlendirilir. Örneğin, analiz edilen gıdada *E. coli* olmadığı halde bir önceki analizde kullanılan pipet gövdesinde *E. coli* kalmışsa analiz sonunda "*E. coli* var." şeklinde sahte pozitif sonuç içeren bir rapor verilecektir.

Standart gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında besiyerleri çok büyük çoğunlukla farklı normlarda olmak üzere otoklavda ya da basitçe kaynatılarak bazen de membran filtrasyonla, cam malzeme ise etüvde kuru sıcak uygulamasıyla sterilize edilir. Isıya dayanıklı plastik pipet uçları ve membran filtrasyon sistemi hunileri gibi malzemeler de otoklavda sterilize edilir. Drigalski spatüllerinin sterilizasyonunda %76'lık (v/v) alkol kullanılır.

Sterilizasyon, bir kavram olarak "belirli bir ortamı tüm mikroorganizmalardan arındırmak" olarak tanımlanır. Buna göre mikroorganizmaları öldürmek şart değildir, membran filtrasyon sadece fiziksel bir ayırımdır.

Dezenfeksiyon ise çok basit bir tanımlama ve çoğunlukla kimyasal madde kullanımı ile bağlantılı olmak üzere "yüzeylerin her türlü hastalık yapıcı

etkenden yani patojenlerden arındırılması (bunları öldürmek ya da güvenilir seviyelere indirmek) için uygulanan kimyasal işlemlerdir".

Bununla birlikte gıda mikrobiyolojisinde sadece hastalık yapıcı etmenler değil saprofitler de ele alınır. Buna göre analiz edilecek numune ambalajının dış yüzünün alkol ya da amaca uygun başka bir kimyasal ile silinerek her türlü mikroorganizma varlığından arındırılması sterilizasyon olsa da uygulama olarak dezenfeksiyondur.

Benzer kavram karmaşaları pastörizasyon ve ticari sterilizasyonda da vardır.

Pastörizasyon, 100 ^{o}C altındaki ısıl işlemi tanımlar. Buna göre, otoklav (basınç) kullanılmadan yapılan nemli sıcak uygulaması, pastörizasyondur. İçme sütü ve meyve suyu için yaklaşık olarak aynı ısıl işlem uygulanmakla birlikte pastörize içme sütünün raf ömrü, soğukta depolamak kaydı ile sadece 1 hafta kadar iken meyve suyu steril kabul edilir ve oda sıcaklığında aylarca depolanabilir. Bu iki gıda arasındaki temel fark asitliktir. Bu kavram aşağıda ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

Bu aşamada ticari sterilizasyon tanımı üzerinde de durulmalıdır.

Nötr pH'lı UHT sütün ya da bezelye konservesinin birim ambalajında yetersiz ısıl işlem nedeni ile sadece bir tek canlı bakteri sporu bile bulunursa bu bakteri sporu hızla vejetatif hale geçer ve sonra çoğalarak ürünü bozar.

Oysa meyve suyu ve konsantresi, reçeller ile salça gibi asitli ürünlerde yetersiz ısıl işlem sonucunda canlı kalan bakteri sporları, ortamdaki yüksek asitlik nedeni ile kolaylıkla vejetatif hale geçip çoğalamaz ya da bu işlem süt ve sebze konservesi gibi nötral ürünlere oranla çok daha uzun sürede gerçekleşir. Buna karşın standart mikrobiyolojik analizlerde besiyerine geçen bu sporlar, asitlik gibi olumsuz koşullardan kurtuldukları için hızla germine olup koloni oluştururlar. Buna göre, standart mikrobiyolojik analizlerde saptanan bu bakterilerin üründe de gelişerek mutlaka bozulma yapacağı anlamı çıkarılmamalıdır.

Asidik ürünlere uygulanan ısıl işlem, bu nedenle "ticari sterilizasyon" adını alır. Bir başka deyiş ile bu gibi ürünler, UHT içme sütünde olduğu gibi mutlak steril olmak zorunda değildir, ancak ticari anlamda steril kabul edilir. Bu ürünlerde canlı kalmış olan bakteri sporları, genellikle sorun çıkarmaz. Uygulanan ısıl işlem, "gelişerek bozulma yapma potansiyeline sahip mikroorganizmaların tahribi için yeterlidir". Bu işlem sırasında enterik patojenlerin tümü öldürülür.

Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin sterilizasyonunda da benzer ilkelerden yararlanılır. *Enterobacteriaceae* üyelerinin analizinde kullanılan ve hepsi selektif katı besiyeri olan VRB agar, VRBD agar, Chromocult coliform agar (CCA), Rambach agar vb. bazı agarlı besiyerleri sadece kaynatılarak "sterilize" edilir. Burada amaç sadece besiyeri, su, kullanılan cam malzeme, tartım kayıkçığı, spatül vb. malzemeden gelebilecek *Enterobacteriaceae* üyelerinin öldürülmesine yöneliktir. Vejetatif formdaki tüm bakteriler, maya ve küfler

uygulanan bu ısıl işlem ile ölür, ancak spor formunda olan bazı Gram pozitif bakteri hücreleri canlı kalabilir.

Besiyerinde canlı olarak kalmış olan sporlu bakterilerin, besiyeri bileşimindeki çeşitli inhibitörler nedeni ile vejetatif hale geçip koliform grup bakterilere benzeyen ya da benzemeyen koloni oluşturma olasılığı, standart analiz süresi olan 24 saat[1] içinde mümkün değildir.

Bu durumda bu gibi besiyerlerine sadece agarın eritilmesi amacıyla uygulanan ısıl işlem, tam bir sterilizasyon değildir. Ancak analizde kullanılacak besiyeri, analize muhatap mikroorganizmalardan tam olarak arındırılmıştır. Analizde hiçbir sorun olmaz.

Salmonella analizinde kullanılan selenite cystine broth besiyeri hazırlanmasında uygulanan ısıl işlem normu, "sadece 60 ^{o}C'a kadar ısıtmak" şeklindedir ve bu norm, doğrudan bu besiyerinde gelişebilecek olan *Enterobacteriaceae* üyelerini öldürmek içindir. Bu besiyeri uzun süre depolanacak ise membran filtre ile sterilize edilmelidir.

Bu gibi besiyerlerinde gereğinden fazla ısıl işlem uygulanması, besiyerine zarar vererek selektif inhibitörlerin etkisini yitirmesine yol açabilir ve sahte pozitif sonuçlar alınabilir. Dolayısı ile sadece agarın eritilebildiği ısıl işlemden daha fazlasından kaçınılmalıdır. Çeşitli kaynaklarda bu gibi besiyerlerinin kaynar su banyosunda sürekli karıştırılarak yaklaşık 35 dk tutulması ile kastedilen "hazırlanmış besiyerinin kaynar su banyosuna koyulduğu" andan itibaren geçerlidir. Ancak 100 mL ve 500 mL olarak hazırlanmış iki farklı hacimdeki besiyerinin ya da ince çeperli bir erlen ve kalın çeperli şişede hazırlanmış iki farklı besiyerindeki agarın farklı sürelerde eriyeceği açıktır. Dolayısı ile kaynar su banyosunda tutma süresi sadece agarın eriyeceği kadardır. Bu amaçla mikrodalga fırın kullanıldığında kaynamaya başladığı anda cihaz kapatılmalı, besiyeri karıştırılmalı, agar tam olarak erimemiş ise devam edilmelidir.

Plate count agar, CASO broth, yarı katı nutrient agar gibi genel besiyerlerinin mutlak steril olması gereklidir.

---

[1] Başta koliform grup bakterilerin ve kimi kaynaklarda diğer mikroorganizmaların da analizinde inkübasyon süresi 24-48 olarak verilir. Bu ifade asıl olarak sayım değil var/ yok testleri için geçerlidir. Buna göre 24 saat inkübasyon sonunda aranan mikroorganizma [var] olarak belirlenirse analiz biter. 24 saat inkübasyon sonunda aranan mikroorganizma [yok] olarak belirlenirse analize 24 saat daha devam edilir. 48 saat inkübasyon sonunda analiz edilen mikroorganizma [var] ya da [yok] olarak kayıtlara geçirilir, daha fazla süre ile inkübasyon yapılmaz. Ancak TS EN ISO 9308-1: 2014 numaralı standartta açıkça bildirildiği gibi CCA besiyerinde sadece 24 saat inkübasyon süresinin dikkate alınması zorunludur ve ilave inkübasyon süresi sonuçları dikkate alınmaz. Çünkü CCA besiyerinin selektivitesi sadece 24 saat için yeterlidir. Refakatçi flora, 24 saatten sonra gelişerek koliform grup bakteriler ve/veya *E. coli* benzeri koloniler oluşturabilir.

VRB agar örneğinde, uygulanan ısıl işlem normu *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerin öldürülmesine değil, agarın eritilmesine göre ayarlanmıştır. Bu amaç için uygulanan ısıl işlemde, *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler zaten öldürülür. VRB agar yanında, Rambach agar, CCA vb. pek çok besiyerinde selektiviteye bağlı olarak, sadece agarın eritilmesi için uygulanan ısıl işlem, bu besiyerlerinde standart inkübasyon süresi içinde olmak kaydıyla gelişebilecek benzer koloni yapısındaki bakterilerin tahribi/ baskılanması için yeterlidir.

Bazı mikrobiyolojik analizlerde kullanılan malzemenin steril olmasına gerek yoktur. Örneğin, Bactident E. coli kiti ile yapılan analizde tipik koliform kolonisi, içinde 0,2 mL saf su bulunan küvette çözülür ve analiz kitine ilave edilip inkübasyona bırakılır. Bu testte kullanılan küvet, su ve kit steril değildir. İnkübasyon 2-4 saat sürer. Küvet, su ya da analiz kitinde tesadüfen bulaşmış *E. coli* varsa, bu süre içinde sahte pozitif sonuç vermeye yetecek sayıya çıkması beklenmez. Pozitif sonuç sadece kolonideki çok yoğun *E. coli* ile alınır.

Genel olarak mikrobiyolojide sterilizasyon denildiğinde ısıl işlem (nemli ve kuru sıcak), membran filtrasyon, kimyasal madde ile sterilizasyon ve ışınlama ile sterilizasyon yöntemleri anlaşılmaktadır. Bunlardan kimyasal madde (etilen oksit) uygulaması, özellikle membran filtrasyon ile yapılan mikrobiyolojik analizlerde kullanılan bazı hazır besiyerlerinin sterilizasyonu için uygulanmaktadır. Kuru hava sterilizasyonu, besiyerlerine ve çözeltilere uygun değildir. Işınlama ise pratik olarak uygulanacak bir yöntem değildir, ancak özel amaçlı dehidre besiyeri üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, ReadyCult Coliforms (bknz⇒ 14.06. Koliform Grup Bakteriler bölümü) ve ReadyCult Enterococci (bknz⇒ 14.19. Enterokoklar bölümü) sırasıyla gıdalarda koliform grup bakteriler ve enterokokların var/ yok testlerinde, CASO (tryptic soy) broth irradiated besiyeri genellikle eczacılıkta kullanılır. Serum gibi steril olması gereken çözeltiye aseptik koşullar altında 30,0 g/L olacak şekilde CASO broth irradiated ilave edilip inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda bu çözeltinin berraklığını koruması, analiz edilen numunenin steril olduğunu gösterir. İnkübasyon sonunda çözelti bulanık ise numunede başlangıçta en az 1 adet canlı olduğu yani numunenin steril olmadığı anlaşılır.

İzleyen bölümde, besiyerleri ve çözeltilerin sterilizasyonunda en yoğun kullanılan nemli sıcak uygulaması hakkında ayrıntılı bilgi verilmiş, diğer sterilizasyon yöntemlerine kısaca değinilmiştir.

05.02. Nemli Sıcak Uygulaması

Nemli sıcak uygulamasının kuru sıcak uygulamasına göre daha etkili olduğu, mikrobiyolojinin ilk gelişme dönemi olan R. Koch zamanından beri bilinmektedir. Yüksek sıcaklıktaki ısıl işlemin mikroorganizmaları öldürdüğü açıktır. Burada nemli ve kuru sıcak uygulaması arasındaki fark, sadece ısı enerjisinin iletilmesidir. Su buharı, ısı enerjisini kuru havaya göre çok daha iyi

bir şekilde ilettiği için sterilizasyonda çok daha etkilidir. Buna göre sterilizasyon etkisi, nemli sıcak uygulamasında 121 °C'ta 15 dk, kuru hava sterilizasyonunda ise ancak 170 °C'ta 2 saat ya da bunun eşdeğeri olmak üzere 185 °C'ta 1 saat içinde sağlanmaktadır.

05.02.01. Otoklavda Sterilizasyon

Işıl işlem, özel olarak aksine bir uyarı yoksa otoklavda ve 121 °C'ta[2] yapılır. Uygulama süresi, bu sıcaklıkta çoğunlukla 15-20 dk olarak verilir. Süt mikrobiyolojisi laboratuvarlarında kullanılan ve yağsız süt tozunun sulandırılması ile hazırlanan yağsız süt (Skim Milk) besiyeri için farklı kaynaklar 110 °C'ta 15 dk ya da 115 °C'ta 10 dk ısıl işlem önerirler. Bu şekilde hazırlanmış yağsız süt besiyerlerin kullanılmadan önce 37 °C'ta 48 saat ya da tercihen 72 saat süreyle inkübe edilerek sterilizasyon kontrolü yapılması önerilir. Bu süre sonunda kesilmiş sütler, analizde kullanılmaz.

Bazı kaynaklarda ısıl işlem normu, sıcaklık ile değil, basınçla gösterilir. Aşağıda basit bir sıcaklık-basınç dönüşüm çizelgesi verilmiştir.

Çizelge 05.01. Sıcaklık-Basınç Dönüşümü

Sıcaklık		Basınç		Sıcaklık		Basınç	
°C	°F	kg/cm^2	psi*	°C	°F	kg/cm^2	psi*
100	212	0,00	0,0	121	250	1,02	15,0
105	221	0,19	2,8	125	257	1,29	19,0
110	230	0,41	6,0	130	266	1,67	24,5
115	239	0,67	9,8	134	273	2,00	29,4

*psi: pound per square inch; inç kareye pound (libre) olarak basınç.

Sterilizasyonun amacı dehidre besiyeri, besiyeri katkıları, cam malzeme, tartım ekipmanı, su, pamuk vb. materyalden gelebilecek mikroorganizmaların tümünü öldürmektir. Böylece besiyerinde gelişen mikroorganizma, çalışma özelliğine göre numuneden/ ana kültürden gelmiş olacaktır. Bu mantık altında besiyerinin sterilize edilmesi için elden geldiği ölçüde yüksek sıcaklık ve uzun süre uygulanması gerekir. Ancak 50 °C üzerindeki sıcaklıklarda besin maddelerinin bileşimi ve agarın jelleşme özelliği olumsuz etkilenir. Bu olumsuzluk, çeşitli kontrol çalışmalarında sahte negatif sonuçların alınmasına yol açabilir.

Bu açıdan bakıldığında da elden geldiği ölçüde düşük sıcaklık ve kısa süre uygulaması bir anlamda zorunluluktur. Kuşkusuz, bu koşulda sterilizasyon sağlanamaz ve kontrol amaçlı çalışmalarda sahte pozitif sonuçlar alınır. Buna bağlı olarak besiyerinin içinde bulunabilecek tüm mikroorganizmaları öldürmek,

[2] Bu değer, aslında 250 °F karşılığı olarak 121,1 °C'tır, ancak pratik uygulamada 121 °C olarak kullanılır.

ancak besiyerine en az zarar verecek bir ısıl işlem normunun seçilmesi gerekir. Bu norm, 121 ºC'ta 15-20 dk olarak ortaya çıkar.

Isıl işlem normunu, öncelikle sterilize edilecek besiyerinin hacmi, besiyerinde agar olup olmaması ve cam malzemenin cinsi etkiler.

Genel bir yaklaşım ile 15 dakikalık ısıl işlem süresi standart test tüplerinden, 250 mL hacme kadar geçerlidir. 500 mL hacim için 20 dk ve 1 L hacim için 25 dk süre kullanılmalıdır.

Prensip olarak, aksi özel olarak belirtilmemiş ise 1 L hacim, otoklavda sterilizasyon için üst sınırdır. Günlük uygulamada önerilen otoklavlama şekli ile 500 mL erlende 250 mL besiyeridir.

Yapılan bir araştırmada aynı et kalınlığına sahip cam kaplar kullanılmış ve besiyeri sıcaklığının otoklavda 121 ºC'a çıkma süresi 500 mL için 18 dk, 1 L için 22 dk, 2 L için 27 dk ve 5 L için 37 dk olarak bulunmuştur. Bu durumda 5 L hacimdeki bir kapta sterilizasyon yapılırken otoklav (kabin) sıcaklığı 121 ºC'a çıktığında sadece 15 dk beklenirse, besiyeri soğuk noktası henüz 121 ºC'a ulaşmamış olacaktır. Yapılan bir başka araştırmada, 20 L damacana içinde 15 L sıvı besiyeri olan bir otoklavlama çalışmasında kabin sıcaklığı 121 ºC'a çıktıktan sonra 35 dk süre ile işlem devam etmiş, ancak damacanadaki besiyeri sıcaklığının bu süre sonunda sadece 117 ºC'a çıktığı gösterilmiştir.

Bir diğer deyiş ile otoklav içi sıcaklık (otoklav kabin sıcaklığı) ile otoklavdaki besiyeri sıcaklığı aynı değildir ve otoklav kabin sıcaklığı olarak ölçülen değer, otoklavdaki atmosferin sıcaklığını göstermektedir. Bazı otoklav modellerinde kabin sıcaklığı yanında sterilize edilecek malzemenin sıcaklığını gösteren proplar da bulunmaktadır.

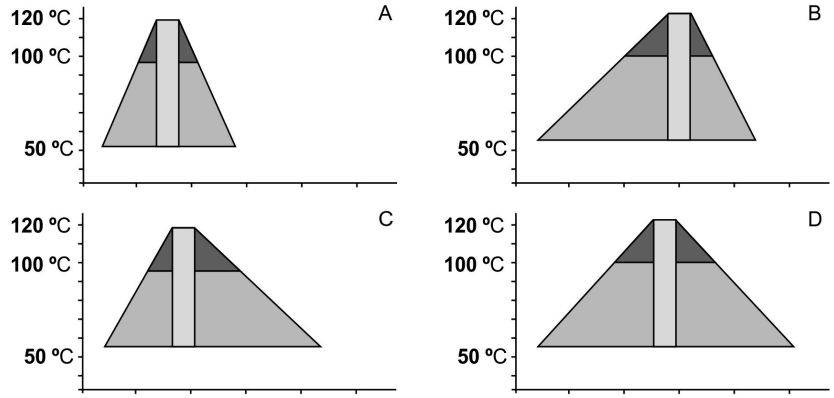
Besiyeri bileşiminde agar varsa ısı iletimi agarsız olanlara göre daha yavaş olacaktır. Agar, ısıyı zayıf ileten bir bileşiktir. Dolayısı ile agarlı besiyeri, hacimle ilişkili olarak agarsız olanlara göre 2-5-10 dk gibi daha uzun süre ile sterilize edilmelidir. Yapılan bir araştırmada ince çeperli bir kapta 500 mL agarlı besiyerinin aynı hacimde normal çeperli bir kaptaki saf suya göre 121 ºC'a 6 dk daha geç ulaştığı belirlenmiştir.

Besiyerinin sterilize edileceği cam kabın et kalınlığı, ısı iletiminde önemli bir faktördür. Doğal olarak ince et kalınlığına sahip standart erlen ve balonlar ısıyı normal bir şekilde iletirken kalın et duvarlı özel şişelerde ilave sterilizasyon sürelerine gerek duyulur.

Otoklavda sterilizasyonda dikkate alınması gereken en önemli ayrıntılardan birisi de "toplam ısı girişi" kavramıdır. Bu kavram, 50 ºC üzerindeki sıcaklık/ süre alanıdır. Şekil 05.01'de 4 farklı otoklavlama örneğinde toplam ısı girişi gösterilmiştir.

Şekil 05.01'de; (a) normal bir otoklavda, (b) arızalı olduğu için geç ısınan bir otoklavda, (c) örneğin öğle saatine geldiği için sterilizasyon sonrası kapalı

bırakılan normal çalışan bir otoklavda ve (d) ise hem arızalı olduğu için geç ısınan hem de sterilizasyon sonrası kapalı bırakılan bir otoklavda 50 °C üzerindeki toplam ısı girişini belirten alanlar gösterilmektedir.



Şekil 05.01. Toplam ısı girişi

121 °C'ta 15 dk olarak verilen ısıl işlem normu, normal olarak çalışan ve çabuk ısıtılıp çabuk soğuyan bir otoklav için verilen toplam ısı girişini belirtmektedir.

Şekilden görüldüğü gibi 121 °C'ta tutma süresi her dört koşulda da 15 dk olmakla birlikte, toplam ısı girişi olarak gösterilen taralı alanlar, standart "a" otoklavı dışındakilerde daha fazladır ve diğer üç koşulda besiyeri gereğinden fazla olarak otoklavda tutulmuştur.

Burada 121 °C'a gelinceye kadar ve 15 dk bekleme süresinden sonraki soğuma sürecindeki ısı girişi hesaba katılmamaktadır. Oysa bunlar dikkate alındığında sterilizasyon etkisinin çok daha yüksek olacağı görülür. Örneğin, 118 °C'ta 1 dk ile 121 °C'ta 0,35 dk tutmanın öldürücü ısıl işlem etkisi eşdeğerdir.

Doğru çalışan bir otoklav, hava çıkışı tamamlanıp basınç uygulamaya başlanmasından 15 dk içinde 120±1 °C'a erişmelidir. Sterilizasyon tamamlandıktan sonra eski model otoklavlarda buhar çıkışının çok az açılarak basıncın kademeli olarak azaltılması zorunludur. Yeni model otoklavlarda basınç otomatik olarak düşürülmektedir.

Otoklavın basıncı çok hızlı olarak düşerse otoklav içindeki besiyeri ve çözeltiler kaynar ve kap dışına taşar. Agarlı besiyerinin otoklav içine dökülmesi ciddi arızalara neden olabilir. İdeal olarak, otoklavda kalma süresi toplam 1 saati geçmemelidir.

Besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılacak otoklavlar farklı şekillerde olabilir. En basit otoklavlar, ev tipi düdüklü tencere benzeri olup bunlara sıcaklık ve basınç göstergeleri eklenmiştir. Standart otoklavlar, yatık ve dik tipte olabilir.

Otoklavda sterilizasyonun esası, havanın su buharı ile yer değiştirmesi ve böylece buhar aracılığı ile ısı aktarımının daha kolay yapılmasıdır. Buna göre otoklavda önce havanın tam olarak çıkması sağlanmalı, sonra basıncın artırılmasına başlanmalıdır.

Hava tam çıkmadan basınç uygulanmaya başlanırsa yer yer kalacak hava paketlerinde sıcaklık istenilen düzeye çıkamaz. Otoklavın aşırı doldurulması, tüplerin cam beher içinde otoklava konulması, vida kapaklı şişelerin ağzının sıkılarak ve tüp ile erlenlerin pamuk ya da tıkaçlarının sıkı olarak otoklava yerleştirilmesi, hava paketlerine neden olur ve sterilizasyon sağlanamaz.

Koliform grup bakteri analizinde kullanılan sıvı besiyerlerindeki standart boy Durham tüplerinde otoklav sonrası hava kalması, bir anlamda sterilizasyon yetersizliğinin göstergesidir. Standart bir sterilizasyonda Durham tüplerindeki hava kendiliğinden çıkar. Bu durum, büyük çoğunlukla tüplerin beher ya da benzeri kaplar içinde otoklavlanması sonucunda görülür.

Vida kapaklı şişeler, aynı nedenle, gevşek olarak kapatıldıktan sonra otoklavlanır ve işlem sonunda otoklav açıldığında kapaklar sıkılır. Eğer besiyeri çok sıcak iken kapaklar sıkılırsa vakum oluşur ve şişe açılırken dışarıdan hava emmeye bağlı olarak kontaminasyon oluşabilir. Bu nedenle vidalı kapaklar, besiyerinin sıcaklığı yaklaşık 50 ^{o}C'a soğuduğu zaman sıkıştırılır.

Otoklavlama sırasında basınç artırılmaya başlanıncaya kadar buharlaşmaya bağlı olarak besiyerinde hacim azalması olur. Otoklav cinsi ve uygulanan işlem gibi nedenlere bağlı olarak hacim azalması %5'ten fazla ise kaybolan hacim kadar steril saf su eklenir. Seyreltme çözeltilerinde tolerans %2 hacim azalmasıdır. Daha fazla hacim azalması varsa nedenleri araştırılmalıdır.

Tüm bu bilgiler çerçevesinde otoklavda sterilizasyon için dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda özetlenmiştir:

-Otoklav etkinliği kontrol edilmelidir. 05.07. Sterilizasyon Kontrolü bölümde bu konuda bilgi vardır.

-Farklı hacimler beraberce otoklavlanmamalıdır. Otoklavda 10 mL hacimde sıvı besiyeri ile kalın et duvarlı bir kaptaki 1 L hacimde agarlı besiyerinin beraberce sterilize edileceği ortalama bir ısıl işlem uygulama süresi aramak tümüyle yanlış olacaktır. Bununla birlikte günlük uygulamada farklı hacim ve bileşenlerdeki besiyerlerini ayrı ayrı otoklavlamak her zaman mümkün olmayabilir. Agarlı besiyerlerinin eritilmek için önceden ısıtılmış olması, toplam ısı girişi çerçevesinde değerlendirilerek bunların sıvı besiyerlerinde olan normlarda sterilize edilmesine olanak tanır. Ancak agarlı besiyerleri, olması gerekenden daha kısa süre ile (örneğin 20 dk yerine 15 dk) otoklavlanıyorsa şahit olarak bu besiyerinden dökülmüş birkaç Petri kutusunun da inkübatöre konulması gerekir.

-Otoklavlama süresi besiyerinin hacmi, kullanılan cam kapların et kalınlığı ve besiyerinin agarlı olup olmamasına göre belirlenmelidir.

-Besiyeri hazırlandıktan sonra ivedilikle sterilize edilmelidir. Dehidre besiyeri ve/veya besiyeri bileşenleri ile cam kaplar, su, tartım ekipmanı vb. materyalde mikroorganizma bulunması doğaldır. Bu mikroorganizmalardan bazıları, hazırlanmış besiyerinde hızla gelişerek besiyerinde başta pH değişmesi olmak üzere bir seri olumsuzluklar meydana getirir. Buna bağlı olarak hazırlanmış besiyerleri en geç 1 saat içinde sterilize edilmelidir. İçinde pepton olan maximum recovery diluent (MRD) ve %0,1 pepton çözeltisi gibi seyreltme çözeltileri de besiyeri gibi düşünülmelidir. %0,85 NaCl bileşimindeki serum fizyolojik ise hazırlandığı gün içinde sterilize edilmelidir. İstisna olarak %10 skim milk besiyeri hazırlandıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında bekletilip sonra otoklavlanmalıdır (bknz ⇒ 01.05. Sporlanma ve Germinasyon bölümü).

-Tüm besiyerleri ısıya duyarlı olan pepton ya da ekstraktları içerir. Bu nedenle aşırı ısı girişinden kaçınılmalıdır. Pepton ve şekerleri içeren besiyeri aşırı ısıl işlem görürse Maillard reaksiyonu (karamelleşme) oluşur. Bu şekilde kararmış besiyerleri, yanlış hazırlandığı gerekçesi ile analizlerde kullanılmaz.

-Agar içeren besiyerleri ısıtılmadan önce birkaç dakika kendi halinde bırakılarak tam ıslanması sağlanmalıdır.

-Her sterilizasyon için tarih, başlama sıcaklığı, sterilizasyon sıcaklığına ulaşma ve bu sıcaklıkta tutulma süresini gösteren kayıtlar tutulmalıdır.

-Kullanılacak besiyerleri ile önceden kullanılmış ve yıkama öncesi sterilize edilecek besiyerleri aynı anda otoklavlanmamalıdır.

Bazı besiyerleri, otoklavda 121 ºC'ta 15 dk'dan daha düşük sıcaklık ve/veya sürelerde tutularak sterilize edilir. Enterobacter enrichment broth ve litmus milk 121 ºC'ta 5 dk sterilize edilir. MRS agar ve MRS broth daha farklı bir örnek olup *Bifidobacter* spp. analizinde kullanılacak ise 118 ºC'ta 15 dk diğer laktik asit bakterileri için kullanılacak ise 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilmesi önerilir.

Tüm besiyerlerinin üretici firma tarafından gösterilen şekilde otoklavlanması gerekir. Aynı besiyerine ait farklı marka ürünlerde de farklı sterilizasyon normları verilebilir.

Aşağıda 05.09. D, z ve F değerleri bölümünde sterilizasyonda sıcaklık ve süre ilişkisi açıklanmıştır. Agar örneğinde olduğu gibi otoklavlanacak materyalin ısı iletimi de dikkate alınmalıdır. Bu özellik, gıda sanayisinde önemlidir ve ısı iletimi düşük gıdaların sterilizasyonunda bazen sorunlarla karşılaşılmaktadır.

05.02.02. Kaynatarak-Isıtarak Sterilizasyon

Bazı besiyerleri, otoklavda sterilize edilmez. Örneğin VRB agar besiyeri, sadece kaynar su banyosunda agarın eriyeceği süre ile tutulur. Yukarıda da belirtildiği gibi kaynar su banyosuna konulan VRB agarın 30-35 dk bekletilmesinin pratik bir anlamı yoktur. Asıl önemli olan bu gibi besiyerlerinde agarın tam olarak erimesidir. Agarın tam olarak eridiği sıcaklık/ süre uygulamasında besiyeri amaca uygun olarak steril olmuştur.

Kaynatılarak hazırlanması gereken besiyerleri, ideal olarak 100 °C'a ayarlanmış otoklavda tutularak sterilize edilir. Bazı elektronik modellerde olduğu gibi otoklav sıcaklığı 100 °C'a ayarlanamıyorsa otoklav bu amaçla kullanılmaz. Bazı otoklavlardaki eritme fonksiyonu, bu amaca uygundur.

Mikrodalga fırın varsa kaynatma amacı ile kullanılabilir. Bu işlemde besiyerinin taşması önlenmeli ve fırın ara sıra çalıştırılarak sıcaklık hep kaynama sıcaklığına yakın tutulmalıdır. VRB agarı kaynama sıcaklığına çok yakın sıcaklıkta birkaç dakika tutmak sterilizasyon için yeterlidir. Aşırı ısıtmanın VRB agar gibi kaynatılarak sterilize edilen tüm besiyerlerinde performansı olumsuz yönde etkileyebileceği de gözden uzak tutulmamalıdır.

Agarın tam olarak eriyip erimediği kontrol edilmelidir. Bu amaçla kaynar su banyosunda tutulan ya da mikrodalga fırında ısıtılan besiyeri ara sıra karıştırılır ve yavaşça çalkalanır. Erlenin iç çeperlerinde erimemiş partikül kalmadığında agar erimiş ve amaca uygun olarak sterilizasyon tamamlanmıştır.

Kimi laboratuvarlarda bu gibi ısıtılarak-kaynatılarak yapılan sterilizasyonlarda ısıtıcı tabla (hot plate) kullanılır. Aynı şekilde erlen ara sıra karıştırılarak ısının tüm kitleye dağılması sağlanır ve erlen iç çeperinde partikül görülmediği anda ısıtma uygulamasına son verilir. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldığında ısının tüm kitleye dağılması daha iyi sağlanır, ancak anafor oluşturacak düzeyde karıştırma yapılmamalıdır.

İster ısıtıcı tabla ister ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılsın, tablanın uzun bir süre çok sıcak olarak kalacağı ve bunun laboratuvar kazalarına/ yaralanmalarına neden olabileceği unutulmamalıdır.

Selenite cystine broth gibi bazı besiyerleri ise 60 °C'ta tutularak sterilize edilir. Bu amaçla sıcak su banyosu kullanılır ve erlen içinde de termometre bulunmalıdır. Sıcaklık istenilen değere ulaştığında birkaç dakika tutulur. Isıl işleme çok duyarlı olan bu tip sıvı besiyerleri filtrasyon ile sterilize edilmelidir.

Kaynatılarak ya da ısıtılarak sterilize edilen besiyerlerinde kullanılan pamukların arasına küçük sineklerin saklanabildiği, bunların kaynatma sürecinde canlılıklarını koruyabildiği ve sonra besiyerine düşerek kontaminasyona neden olabildiği görülmüştür. Laboratuvarda bulunan pamukların belirli sürelerde etüvde ya da otoklavda sterilize edilmesi, bu sorunu ortadan kaldırır. Örneğin, 250 mL VRB agar hazırlanmasında 250 mL saf suyun erlene konulup pamuklanarak otoklavda sterilize edilmesi, dehidre besiyerinin bu steril erlene ilave edilmesi ve kaynatılması en güvenli yoldur.

05.02.03. Tindalizasyon[3]

Otoklavın arızalı olduğundan ya da doğru çalıştığından endişe ediliyor ise Tindalizasyon (ardışık ısıl işlem) uygulanabilir. Bu amaçla besiyeri ya da çözelti, kaynar su banyosunda 80 °C'ta 1 dk tutulup hızla oda sıcaklığına soğutulur ve bu sıcaklıkta 1 saat bekletilir.

Bu uygulama, bakteri sporlarının germinasyonunu (vejetatif hale geçmesini) teşvik eder. Sonra besiyeri ya da çözelti kaynar su banyosunda kaynama sıcaklığında (95-98 °C) 30 dk tutulur. Bu aşamada maya ve küflerin spor ve vejetatif formları ile bakterilerin vejetatif hücreleri ve ısıya dayanıksız sporları öldürülmüş olur. Canlı kalanlar, sadece ısıya dayanıklı bakteri sporlarıdır. Ardından besiyeri ya da çözelti hızla soğutulup oda sıcaklığında 4 saat bırakılır. Bu süre içinde sporların tümüyle vejetatif hale geçeceği kabul edilir. Bu işlem iki kez daha uygulanır. Son uygulama sterilizasyon güvenliği içindir.

Tindalizasyon işleminde sporların germinasyonunu teşvik etmek için 80 °C'ta 1 dk ısıtma kritiktir ve bu sıcaklık kontrol edilemediği için bu amaçla mikrodalga fırın kullanılmaz. 95-98 °C'ta 30 dk tutma aşamasında kontrollü olarak mikrodalga fırın kullanılabilir.

John Tyndall tarafından tarif edilen orijinal yöntem, materyali kaynama sıcaklığında 15 dk tutup ertesi ve daha ertesi gün bu işlemi tekrarlamaktır. Böylece işlem, 3 günde tamamlanmış olur.

Her koşulda Tindalizasyon ile sterilize edilmiş besiyerinin kontrol örneği inkübatöre bırakılarak sterilizasyon kontrolü yapılmalıdır.

05.02.04. Düdüklü Tencere Uygulaması

Otoklav arızalıysa, Tindalizasyon için vakit yoksa ve başka makul hiçbir seçenek yoksa acil durumlarda ev tipi düdüklü tencere de besiyerleri ve çözeltilerin sterilizasyonunda kullanılabilir. Ev tipi düdüklü tencerelerin çok farklı modelleri olduğu bilinmektedir.

Bu uygulamada kritik kelime "kemikli et pişirmektir". Besiyeri ya da çözelti kemikli et pişirir gibi düdüklü tencerede sterilize edilebilir. Her koşulda, düdüklü tencerede sterilize edilmiş besiyerinin kontrol örneği inkübatöre bırakılarak sterilizasyon kontrolü yapılmalıdır.

05.02.05. Diş Hekimlerinin Kullandığı Otoklav

Diş hekimlerinin kullandıkları materyali sterilize etmek amaçlı olarak kullanılan otoklavlar, besiyeri ve çözeltilerin sterilizasyonu için uygun değildir. Diş hekimlerinin kullandığı materyal, bu otoklavlarda güvenli bir şekilde sterilize

[3] John Tyndall (1820-1893) tarafından geliştirilen bu yöntem, Tindalizasyon adı ile anılır.

edilir. Kabin sıcaklığının 121 ºC'a çıkması ve bu sıcaklıkta 15 dk bekleme süresi ile bu materyalin yüzeyi güvenli bir şekilde sterilize edilir.

Ancak besiyerleri ve çözeltiler bu sıcaklıkta sterilize edilemez. Bu tip otoklav kullanan gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarının bu otoklavın yeterli sterilizasyon sağlayacağı (soğuk noktanın 121 ºC'a eriştiği) süreyi kontrol etmeleri gereklidir.

Her koşulda, diş hekimlerinin kullandığı otoklavda sterilize edilmiş besiyerinin kontrol örneği inkübatöre bırakılarak sterilizasyon kontrolü yapılmalıdır.

05.03. Kuru Sıcak Uygulaması

Besiyerleri ve çözeltiler gibi sıvı materyalin kuru sıcakta sterilize edilmesi söz konusu değildir. Kuru sıcak uygulamasında, etüvde sadece cam Petri kutuları, cam pipetler vb. gibi cam malzeme sterilize edilir. Sürtme (svap) örneği almak amacıyla ucuna pamuk sarılmış tahta ya da tel materyal ve homojenizasyon amaçlı kum da etüvde kuru sıcaklık uygulaması ile sterilize edilir.

Etüvde uygulanacak ısıl işlem normu, farklı kaynaklarda farklı şekilde verilmektedir. Bu kitapta benimsenen norm, FDA tarafından bildirilen şekli ile 170 ºC'ta 2 saattir.

Her sterilizasyon için tarih, başlama sıcaklığı, sterilizasyon sıcaklığına ulaşma süresi ve bu sterilizasyon süresinin uzunluğunu gösteren kayıtlar tutulmalıdır.

05.04. Membran Filtrasyon

Sadece bazı vitaminler, aminoasitler ve şekerler gibi ısıl işlem ile sterilize edilemeyen besiyeri bileşenleri ayrıca buharları otoklava zarar verebileceği gerekçesi ile seyreltik asitler de membran filtrasyon ile sterilize edilir.

Rehidre (sulandırılmış) sıvı besiyerlerinin membran filtrasyon ile sterilize edilmesi, alışılmış bir yöntem değildir. Sadece hazırlandıktan sonra 4-5 saat içinde kullanılmayacak olan selenite cystine broth ve urea broth gibi bazı özel besiyerleri membran filtre ile sterilize edilir. Bununla birlikte başka bir geçerli seçenek yoksa broth formundaki besiyerleri ve çözeltiler de membran filtrasyon ile sterilize edilebilir. Agarlı besiyerleri membran filtrasyon ile sterilize edilemez.

Besiyeri ve çözeltilerin sterilizasyonunda genellikle 0,45 µm ya da daha kesin sterilizasyon sağlamak üzere 0,20 µm por çaplı steril membran filtreler kullanılır. Yaygın olarak kullanılan filtreler tek kullanımlık (disposal) olup bir şırınga ucuna vidalanır. Sterilize edilecek sıvı şırıngaya çekilir, filtre şırıngaya vidalanır ve bu şekilde vidalanmış filtreden geçirilen sterilize edilmiş sıvı, steril bir kaba aktarılır.

Filtre ile sterilizasyonda dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda özetlenmiştir:

-Filtre edilecek çözeltinin tam çözülmüş olması gerekir.

-Filtre edilmiş çözelti (filtrat) mutlaka steril bir kaba aktarılmalıdır.

-Filtrede sadece standart boydaki mikroorganizmalar tutulur, ancak virüs ve çok küçük boylu bazı mikroorganizmalar filtre altına geçer. Buna göre membran filtrasyon uygulamasının mutlak bir sterilizasyon olmadığı gözden uzak tutulmamalıdır. Ancak günlük analizlerde membran filtrasyon ile yapılan sterilizasyon tümüyle yeterlidir.

05.05. Kimyasal Madde ile Sterilizasyon

Kimyasal maddelerin mikroorganizmalar üzerine farklı etkileri vardır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında en yoğun kullanılan dezenfektan, alkoldür. Aksine bir belirtme olmadığında alkol denildiğinde "etil alkol" anlaşılır. Gerek yayma ekimde kullanılan Drigalski spatüllerinin gerek ambalajın gerekse çalışma tezgâhlarının dezenfeksiyonunda yaygın olarak alkol kullanılır. Otomatik pipetlerin gövde kısmının analize başlamadan önce 2 dk süre ile alkolde bekletilmesi önerilir. Bunun nedeni, önceki kullanıcının hatalı olarak pipetin gereğinden fazla hızlı kullanması sonucu gövdenin bulaştırılma (kontamine edilmiş olma) olasılığıdır.

Genel olarak kimyasal maddelerin derişimi arttıkça dezenfeksiyon etkileri de artar. Ancak bir istisna olarak alkolün en etkili olduğu derişim %76 (v/v)'dir. Buna göre %76'lık alkol, saf alkolden daha fazla etkilidir. %76 (v/v) alkol hazırlanması için basit olarak saf (~%96) alkolden 4 hacim alınıp, üzerine 1 hacim saf su ilave edilir[4].

Alkol ile sterilizasyonda aşağıdakilere dikkat edilmelidir:

-Alkol ile temas süresi en az 2 dk olmalıdır. Yoğun olarak çalışılan denemelerde yeteri kadar cam Drigalski spatülü bulundurulmalıdır. Sporlu bakteriler, alkol ile dezenfeksiyona daha dirençlidir ve standart toplam bakteri sayımları sırasında olduğundan daha fazla sayım sonucuna neden olabilirler.

-Alkolün etkinliği, her çalışma periyodunda kontrol edilmelidir. Bu amaçla ekim işlemi bittikten sonra kullanılmış alkolden bir adet plate count agar besiyerine 0,1 mL aktarılıp standart şekilde yayma yapılır ve Petri kutusu 28 ^{o}C'ta 48 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra bu Petri kutusunda hiçbir mikroorganizma gelişmesi görülmemelidir.

-Alkol açıkta bırakılırsa suya göre daha fazla buharlaşır, derişimi düşer ve etkisi azalır. Bu nedenle işi biten alkol, ağzı sıkıca kapanan bir kapta korunmalıdır.

[4] Aslında 76 hacim %96 alkole 20 hacim saf su ilave edilir. Bir diğer deyişle 3,8 hacim %96'lık alkol ve 1 hacim saf su kullanılır, ancak günlük uygulamada 4 hacim %96'lık alkol üzerine 1 hacim saf su ilave edilir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında içinde patojen olan bir kabın düşüp kırılması gibi karantina uygulanması durumunda alkol yeterli olmaz. Buna bağlı olarak laboratuvarda gerek bu tip kazalara karşı gerek işe başlamadan gerekse iş bitiminde çalışma masaları ile ellerin dezenfeksiyonunda kullanılmak üzere ticari olarak hazırlanmış dezenfektanlar bulundurulmalıdır.

Patojenlerle çalışıldığında, pipet ya da pipet ucu gibi kullanılmış malzemenin doğrudan dezenfektan içeren bir sıvıya bırakılması gerekir. Bu gibi uygulamalarda kullanılacak dezenfektan derişimi ve uygulama süresi, üretici firma talimatına göre yapılmalıdır. Bu şekilde dezenfekte edilecek materyalin tümüyle ıslanması ve kap içinde hava kabarcıkları kalmaması sağlanmalıdır.

Ev tipi çamaşır suyu da etkin bir kimyasal dezenfeksiyon için kullanılabilir. Ticari olarak pazarlanan çamaşır sularında sodyum hipoklorit derişimi genellikle %5 (50.000 ppm)'dir. Çamaşır suyu kullanılarak 500 ppm (1:100 seyrelti) olarak hazırlanan çözeltide kullanılmış tüm malzeme tam ıslanacak şekilde bir gece bekletildiğinde sporlu bakteriler dâhil olmak üzere gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren tüm mikroorganizmalar yok edilmiş olur. Sterilizasyonda yüksek sıcak uygulamasında olduğu gibi kimyasal madde ile sterilizasyonda da kimyasalın derişimi arttıkça daha kısa süreli uygulama söz konusudur. İstisna olarak, etil alkol için en etkili derişim %76 (v/v)'dır.

Mikroorganizma kültürlerinin yıkama öncesi sterilizasyonu çoğunlukla otoklavda yapılmakla birlikte bazen kimyasal dezenfeksiyon uygulanır. Standart boyda Petri kutusundaki kültür için en az 10-15 mL dezenfektan gece boyunca uygulanmalıdır. İndol testinden sonra tüplerin kendi halinde bir gece bırakılması ile Kovacs' ayıracındaki kimyasallar yeterli dezenfeksiyon sağlar.

Dezenfektanların çoğunun toksik etkisi olduğu unutulmamalıdır. Dezenfektan uygulamasından sonra malzeme iyice çalkalanmalı, sonra yıkanmalıdır. Ellerin dezenfeksiyonu için kullanılan bazı dezenfektanlarda uygulamadan sonra ellerin çalkalanmaması gerekir.

05.06. Işınlama ile Sterilizasyon

Işınlama uygulaması, iyonlaştırıcı radyasyon ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak iki ana gruba ayrılır. İyonlaştırıcı radyasyonun yaydığı enerji, 30-34 eV'tan daha yüksektir; X ve gama (γ) ışınları bu grupta yer alır. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon ise bu değerlerden daha düşük enerji yayar ve UV ışını bu grupta yer alır.

Dalga boyu 10 nm'den (100 ºA) daha kısa olan X ışınları ve dalga boyu 0,1 nm'den daha kısa olan gama ışınlarının penetrasyon yeteneği vardır ve buna bağlı olarak ambalajlanmış materyalin sterilizasyonunda kullanılır. Penetrasyon yeteneği olmayan UV ışınlarının dalga boyu çok daha yüksektir. Endüstriyel uygulamalarda ^{60}Co ve ^{137}Cs kaynağından elde edilen gama ışınları ile X ışınları kullanılır.

UV ışınının endüstride kısıtlı bir kullanımı vardır. Ancak UV ışınlarının kolayca sağlanan lambalardan elde edilmesi ve kullanım kolaylığı nedeniyle hava, berrak su kaynakları, elma şarabı gibi gıdalar ve düzgün yüzeylerde mikroorganizma yükünün indirilmesinde kullanımları söz konusudur.

UV spektrumunda farklı dalga boylarında UV ışınları vardır. MUG reaksiyonunun belirlenmesinde ~366 nm uzun dalga boylu UV ışını kullanılırken 210-300 nm dalga boyundaki UV ışınları, yüksek soğurulmalarına (absorblanmasına) bağlı olarak kuvvetli öldürücü etki yapar. UV spektrumu içinde mikroorganizmalar üzerine en fazla etkili olanı, 253,7 nm dalga boyundaki ışındır. Bu dalga boyu, UV spektrumunda UV-C olarak tanımlanır.

Temel fizik yasaları uyarınca, UV ışınının etkisi aydınlatma gibidir. UV ışınının etkisi kullanılan lambanın gücü ile doğru, lamba ile sterilize edilecek materyal arasındaki uzaklığın karesi ile ters orantılıdır. Buna göre tavana asılmış bir UV lambası kullanıldığında tavana yakın olan yerlerdeki mikroorganizmalar, tabana yakın olanlardan daha fazla etkilenir.

UV lambaları, mikrobiyoloji laboratuvarlarında havanın ve çalışma tezgâhlarının sterilizasyonu için kullanılır. Pratik uygulamada, UV lambaları gece boyunca açık bırakılır. Bu ışına uzun süre ve yakından bakılması halinde gözde önemli hasarlar meydana gelebilir. Bu nedenle UV lamba düğmesinin laboratuvar kapısının dışında olması önerilir. Kapalı bir kabin içine yerleştirilmiş UV lambaları etrafından hava geçirilerek kullanılan endüstriyel sistemler de vardır. Basit olarak bir varil ya da benzeri uygun bir kapalı materyal içine UV lambalar enine ya da boyuna olarak yerleştirilir, alttan havanın emilmesi ve üstten UV lambadan geçmiş havanın basılması (ya da tersi uygulama) ile çalışma ortamında makul ölçüde mikroorganizma indirgemesi sağlanabilir.

UV lambalarının kullanımında belirli bir "lamba ömrü" olduğu dikkate alınmalıdır. Bu süre sonunda lambadan ışıyan aynı açık mavi ışık görülür, ancak bunun içinde etkili dalga boyunda UV ışını kalmamıştır. UV lamba kullanılacak ise satıcı firmadan standart kullanım ömrü öğrenilmelidir. Farklı markalarda farklı kullanım ömrü olabilir. Günümüz teknolojisi ile üretilmiş UV-C lambaların etkili kullanım ömrü, genel olarak 9000 saattir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı açısından X ve gama ışınlamasının pratik uygulaması yoktur. Sadece ışınlanmış tryptic soy broth ve ReadyCult gibi uygulamalar için kullanılmaktadır.

Bal, doğal antiseptik madde olarak kabul edilir ve özellikle kırsal kesimde çeşitli yaralanmalarda açık yara üzerine sürülerek yaranın mikrop kapması engellenmeye çalışılır. Bu geleneksel (ampirik) bilginin ne denli geçerli olduğu bu kitapta tartışılmayacaktır. Çin Halk Cumhuriyeti, dünyada en fazla bal üreten ülkedir ve diğer ülkelerden farklı olarak bu ülkede üretilen balın büyük çoğunluğu gama radyasyonu ile ışınlanmaktadır. Bunun nedeni balda bulunması muhtemel *Cl. botulinum* sporlarının açık yaraya bulaşması koşulunda çok ciddi sağlık sorunlarına neden olacağıdır.

05.07. Sterilizasyon Kontrolü

Sterilizasyon işleminin etkinliği, kimyasal ya da biyolojik indikatörler ile kontrol edilir. Kimyasal indikatörlerin en yaygın kullanılanı otoklav şeritleridir. Otoklava konulan malzemeye bu şeritlerden yapıştırılır. Standart otoklavlama süresinde (121 ºC; 15 dk) şerit, renk değiştirir. Aynı uygulama, kuru hava sterilizasyonu için de yapılmaktadır. Kuru hava ve otoklav sterilizasyonu için farklı şeritler kullanılır.

Otoklavda sterilizasyon kontrolü için biyolojik sterilizasyon indikatörü (Sterikon) kullanılması da önerilir. Bu kullanım pek çok uluslararası standartta yer almaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan bakteri, *Geobacillus stearothermophilus* (syn. *Bacillus stearothermophilus*) sporlarıdır. Bu sporlar, içinde 2 mL nutrient broth ve bir pH indikatörü olan ampul içinde yaklaşık 10^7 sayıda bulunur. Sporların 121 ºC'taki D değeri 2 dk'dır. Buna göre 121 ºC'ta 15 dk ısıl işlemde ölürler.

Standart bir otoklavlama işleminde 250 L hacme kadar olan otoklavlar için 2 ampul, daha büyük olanlar için 6 ampul farklı yerlere yerleştirilir. Otoklavlama sonunda ampuller, otoklavlanmamış olan şahit 1 ampul ile birlikte 60 ºC'ta 48 saat inkübe edilir. Otoklav doğru çalışıyorsa (121 ºC'a erişip bu sıcaklıkta 15 dk kalıyorsa) ampul içindeki tüm sporlar ölmüş olacağı için inkübasyon sonunda ampullerde bir değişiklik olmaz ve menekşe renk korunur. Aksi halde ampulde sterilizasyon yetersizliği nedeni ile tek bakteri sporu bile canlı kalırsa bu spor önce germine olur, sonra hızla çoğalır ve pH indikatörü aracılığı ile ampul rengi sarıya döner. Kontrol ampulü (otoklavlanmamış şahit), inkübasyon sonunda sarı renk almalıdır. Aksi halde, inkübasyon sonucu menekşe rengin korunması dikkate alınmaz. Çünkü ampulde canlı bakteri yoktur.

Alışılagelmiş bir sterilizasyon kontrol yöntemi "şahit besiyeri" kullanmaktır. İnoküle edilmemiş bir besiyerinin inoküle edilmişler ile birlikte inkübe edilmesi, sterilizasyonun ne denli sağlandığını gösterebilir. Bu konuda yapılabilecek büyük bir hata, içinde agarlı besiyeri olan Petri kutularının tümünün 48 saat inkübatörde bırakılarak sterilite testi yapılmasıdır. Böyle bir uygulamada steril olduğuna karar verilen besiyerlerinde gereğinden fazla kuruma olacak ve ekim sonrası istenilen performans alınamayacaktır.

Kuru sıcak uygulamasında sterilizasyon etkinliği, *Bacillus atrophaeus* (syn. *Bacillus subtilis* var*. niger*) ile kontrol edilir. Standart kuru hava sterilizasyonu öncesinde, etüvde farklı yerlere konulacak cam Petri kutuları içine 10^6 düzeyinde spor emdirilmiş olan şeritler yerleştirilir. İşlem bitince bu şeritler tryptic soy broth besiyeri içine atılıp 28-30 ºC'ta 48 saate kadar inkübe edilir.

Sterilizasyon yeterli bir şekilde yapıldı ise besiyerinde bir gelişme olmaz. Aksi halde besiyeri renginde bir bulanıklık olursa sporların öldürülmesinin yetersiz kalmış olduğu anlaşılır.

Membran filtrasyon ile yapılan sterilizasyonun kontrolü için her cm^2 filtre yüzeyine 10^7 KOB gelecek şekilde *Brevundimonas diminuta* (syn. *Pseudomonas diminuta*) içeren seyreltme çözeltisi filtre edilir ve 10 mL filtrat, 10 mL çift kuvvetli tryptic soy brotha ilave edilerek 28-30 ^oC'ta 48 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyerinde gelişme (bulanıklık) görülmemelidir. Bu test özellikle 0,2 µm porlu membran filtrelere uygulanır.

05.08. Sterilize Edilmeyen Çözeltiler

Besiyerlerinin bileşimine giren antibiyotikler gibi bazı katkıların sterilizasyonuna gerek yoktur. İlgili talimatlarda yazıldığı şekilde üzerlerine sadece steril su (ya da steril su + alkol) ilave edilir. Çözelti halinde ise doğrudan kullanılır.

Yumurta sarısı ile yumurta sarısı tellurit emülsiyonu gibi bazı katkılar üretici firma tarafından önceden pastörize edildikleri için ayrı bir sterilizasyon işlemine gerek yoktur. Bununla birlikte çoğu üretici firma tarafından yumurta ve ürünlerinin sterilizasyon kontrolü yapılması önerilir.

Yumurta sarısı emülsiyonunun laboratuvarda hazırlanması gerekli ise yumurtalar %76 (v/v) etil alkol çözeltisinde en az 5 dk tutulur. Sonra sarısı ve beyazı ayrılıp sarısı steril bir kaba alınır. Bu amaçla dış kabuğu kirli olan ya da kirli olduğundan endişe edilen yumurtalar kesinlikle kullanılmamalı, kirli kabuğun fırçalanarak temizlenmesi yoluna asla gidilmemelidir. Laboratuvarda hazırlanan yumurta sarısı, egg-yolk ya da egg-yolk tellurit gibi besiyeri katkısı olarak kullanılacaksa bu katkıların orijinal formüllerine dikkat edilmelidir.

Başta kanlı agar olmak üzere çeşitli besiyerlerinin bileşimine katılan kanın "steril olduğu" kabul edilir. Bunun için sağlıklı bir hayvandan aseptik koşullara uyarak kan alınmalıdır. Kanlı agar, tercihen dış laboratuvardan sağlanmalıdır.

05.09. D, z ve F Değerleri

Öldürücü düzeyde herhangi bir işlemin (ısıl işlem, kimyasal madde uygulaması, ışınlama) canlılar üzerindeki etkisi, zamana bağlı bir fonksiyon olarak verilir. Tam olarak tanımlanmış bir uygulamada belirli bir canlı türü için sayının %90'ının (1 log birimi) azalması için gereken süre D değeri (desimal indirgeme süresi) olarak tanımlanır ve dakika ile ifade edilir. D değeri, öldürücü bir işlemin etki süresi ile ilgilidir ve bu nedenle sadece fiziksel bir ayırma işlemi olan membran filtrasyon için söz konusu değildir.

Buna göre;

-Uygulamanın yapıldığı ortam, tam olarak tanımlanmalıdır (yağsız içme sütü, yarım yağlı dana kıyması vb.).

-Hedef mikroorganizma, tür hatta serotip düzeyinde tanımlanmalıdır (*Bacillus cereus* sporu, *E. coli* O157:H7 serotipi vb.).

-Uygulanan işlem, tam olarak tanımlanmalıdır (108 ºC'ta buharlı sterilizasyon, ışınlama, %73 alkol vb.).

Geobacillus stearothermophilus sporlarının nutrient broth ortamında 121 ºC'taki D değerinin 2 dk olması, her 2 dk sonunda spor sayısında 10 misli (1 log birimi) azalma olacağını (sporların %90'ının ölüp %10'unun canlı kalacağını) ifade eder. Bir diğer deyiş ile 121 ºC'ta başlangıçta (0 anı) 10^7 olan spor sayısı 2 dk sonra 10^6, 4 dk sonra 10^5, …. 14. dk sonra 10^0=1 bakteriye düşecek ve 1 dk sonra bu bakteri de öleceği için bu spor süspansiyonunu içeren ampul (ticari adı= Sterikon) sterilize edilmiş olacaktır. Aslında burada toplam 7,5 logaritma birimi canlılık azalması sağlanmıştır ve bu azalma 7,5 D indirgeme olarak tanımlanır. Bu süre sonunda 1 ampul içindeki canlı spor sayısı 0,36'dır ve bunun anlamı 1 ampul içinde 1 sporun canlı kalma olasılığının %36 olmasıdır. Isıl işlem 16 dk sürdürülmüş olsa idi 16/ 2= 8 D'lik indirgeme sağlanacaktı, bunun da anlamı ampulde 0,1 adet canlı spor kalmıştır yani 1 adet canlı sporun bulunma olasılığı %10'dur. Çizelge 05.02'de zamana bağlı olarak *Geobacillus stearothermophilus* sporlarının nutrient broth ortamında 121 ºC'taki canlılık azalması gösterilmiştir.

Çizelge 05.02. *Geobacillus stearothermophilus* için D değeri örneği

Süre	log KOB/ mL	İndirgeme (D)
0	10^7	0
2	10^6	1
4	10^5	2
6	10^4	3
8	10^3	4
10	10^2	5
12	10^1	6
14	10^0	7
16	10^{-1}	8
18	10^{-2}	9

Görüleceği gibi sayının 0 olması matematiksel açıdan mümkün değildir ya da süre sonsuza eriştiğinde sayı 0 olur. Bu durumda belirli bir süre ısıl işlemden sonra materyal steril kabul edilir.

Aynı mikroorganizma, aynı öldürücü işlem olsa bile ortamın pH'sı ve şeker derişimi gibi faktörler D değeri üzerine önemli etki yapar. pH ne kadar düşük ise ısıl işlemin etkisi o denli artar. Yüksek şeker derişimi bazen mikroorganizma üzerinde koruyucu etki oluşturur. Benzer şekilde ortamda protein ve yağ bulunması da ısıl direnci artırır. Bu nedenle D değeri ifade edilirken ortam belirgin bir şekilde tanımlanmalıdır.

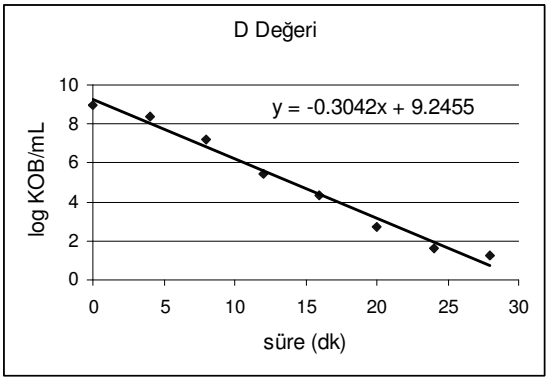
Isıl işlemde D değeri, uygulanan sıcaklık ile birlikte verilir. D_{109}= 0,3 dk, 109 ºC'ta her 0,3 dk'da (18 sn'de) canlılıkta 1 log azalma olacağını gösterir.

Endüstriyel ışınlamada, D değeri kavramı farklıdır. Isıl işlemde farklı sıcaklıklar ve kimyasal uygulamada farklı derişimler uygulanmakla beraber ışınlamada derişim farkı yoktur. Işın kaynağının belirli bir gücü vardır. Bu güç, ilave üniteler ile artırılsa bile öldürücü etki, canlının soğurduğu enerji ile ilişkilidir. Işın kaynağının Co^{60} ya da Cs^{137} olması da önemli değildir. *E. coli* için gama ışınlamada yağsız kıyma için D_{10}= 0,30 kGy ifadesi, gücü ne olursa olsun bir ışın kaynağından elde edilen gama ışınlarının her 0,30 kGy uygulanması halinde canlılıkta 1 log azalma olacağını gösterir. Bazı ışın kaynakları, bu dozu 30 dk'da, bazısı 5 dk'da verebilirse de bu önemli değildir ve D değeri yaklaşımı ile uyumsuz olmaz. Önemli olan, kaç kGy ışın verildiğidir.

Isıl işlemde "D" altında genel olarak uygulanan sıcaklık derecesi verilirken ışınlamada genel olarak "D altında 10" yazılır. Bunun nedeni ışınlama ile ısıl işlem arasında yukarıda açıklanan farklılıktır ve logaritmik bir işlem olduğunu belirtmek üzere D_{10} olarak belirtilir. Isıl işlemde de D_{10} belirtmelerine rastlanır. Bu belirtme, $\log_{10}$ ifadesi gibidir.

Aşağıda D değeri hesaplaması için bir örnek verilmiştir.

Süre (dk)	log KOB/mL
0	8,96
4	8,38
8	7,20
12	5,41
16	4,34
20	2,69
24	1,65
28	1,25



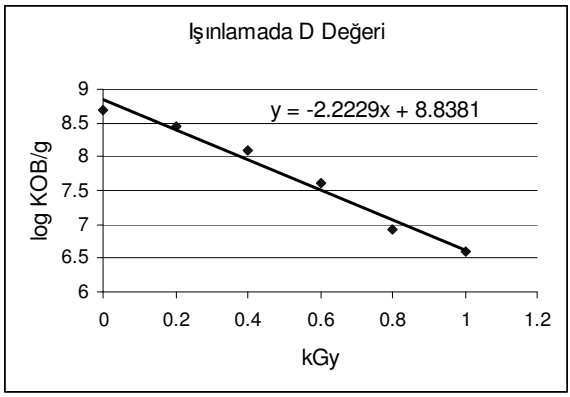
Elde edilen verilerin bilgisayar ortamında MS Excel ya da benzeri bir program kullanılarak grafiği çizilir. Eğim çizgisinin formülünü bu program verir. Bu örnekte Y= -0,3042X + 9,2455 olarak elde edilen denklemde, Y için ardışık 2 sayı (örneğin, 5 ve 6) verilerek bunlara karşı gelen X değerleri hesaplanır. Fark, D değeridir. Yine bu örnekte Y= 5 için X= 13,97 ve Y=6 için X= 10,63 olarak bulunur ve bu 2 X değeri farkı olan 3,34 dk[5] ≅ 200 sn, D değeri olarak hesaplanır. Başka 2 Y değeri için başka D değerleri elde edilir. Bu nedenle D değeri, grafiğin eğim çizgisinin formülü ile hesaplanır. Grafiğin eğimi basit olarak y= ax+b doğrusundaki [a] katsayısıdır.

[5] 3,34 dk; 3 dk ve 34 sn anlamında değildir. 1 dk 60 sn olduğuna göre basitçe 3,34 x 60= 200,4≅ 200 sn.

D değeri ise 1/ eğim= 1/ 0,3042= 3,2873 dk≅ 197 sn olarak bulunur. Bunun anlamı, çalışmanın yapıldığı gıdada, uygulanan sıcaklıkta hedef mikroorganizma sayısında her 197 sn'de 1 log azalma olacağıdır.

Bir başka örnekte, *E. coli* yağsız kıymaya aşılanmış, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ve 1 kGy ışınlandıktan sonra elde edilen canlılık azalması log KOB/g olarak verilmiştir. Aşağıda bu değerlerin grafiği gösterilmiştir.

kGy	log KOB/mL
0	8,69
0,2	8,45
0,4	8,09
0,6	7,62
0,8	6,92
1,0	6,59



Bu örnekte D değeri, y= -2,2229x + 8,8381 formülünden gidilerek 1/ 2,2229≅ 0,45 kGy olarak hesaplanır. Bunun anlamı, yağsız kıymada her 0,45 kGy ışınlamada *E. coli* canlılığında 1 log azalma olduğudur. Farklı ışın kaynakları, kaynak gücüne bağlı olarak 0,45 kGy ışını farklı sürelerde verirler. Dolayısı ile ışınlamada z değeri yoktur.

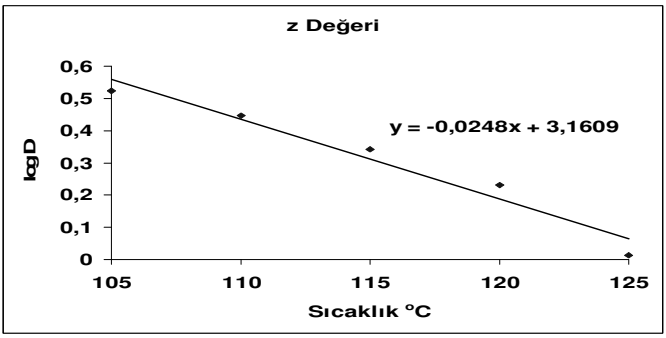
Genel bir yaklaşım ile öldürücü etkiye sahip uygulamalarda derişim arttıkça öldürücü etki de artar (alkol bu genellemenin dışındadır). Buna göre 96 ºC'ta yapılan uygulamada D_{96}= 3 dk olarak bulunuyorsa aynı koşullarda ve aynı mikroorganizma için sıcaklık artırıldığında daha kısa ve tersine olarak sıcaklık azaltıldığında daha uzun süreli D değerleri elde edileceği açıktır. Benzer şekilde bir kimyasalın %1 derişimde D değeri 4 dk ise %2 derişimde daha kısa ve %0,2 derişimde daha uzun D değerleri elde edilecektir.

Z değeri, genellikle ısıl işlem için kullanılan bir kavramdır ve ºC olarak ifade edilir. D değerinde 1 log birimi değişiklik için gereken sıcaklık değişimi olarak tanımlanır. Hesaplanmasında, belirli bir gıda numunesinde belirli bir mikroorganizma türü için farklı sıcaklıklarda D değerleri elde edilir. Grafik çizilirken D değerlerinin logaritmaları kullanılır.

Aşağıdaki örnekte z değeri benzer şekilde y= -0,0248x + 3,1609 formülü üzerinden 1/ 0,0248= 40,3 ºC şeklinde hesaplanır. Bunun anlamı, D değerinde 1 log değişme için gereken sıcaklığın 40,3 ºC olduğudur. Örneğin, 110 ºC'ta 2,80 dk (168 sn) olan D değeri, 110 + 40,3= 150,3 ºC'ta 0,28 dk (16,8 sn) olacaktır. Tersine olarak 110 - 40,3= 69,7 ºC'ta 28 dk olarak hesaplanabilir. Ancak 110 - 40,3 - 40,3= 29,4 ºC'ta D değeri bir logaritma birimi daha artarak

280 dk olarak hesaplansa bile 29,4 ºC, öldürücü bir sıcaklık olmadığı için bu sonucun bir anlamı yoktur. Aynı şekilde 110 + 40,3 + 40,3= 190,6 ºC'ta D değeri 0,028 dk (1,68 sn) olacaktır, ancak bunun da pratik anlamı yoktur.

Sıcaklık (ºC)	D (dk)	log D
105	3,34	0,524
110	2,80	0,447
115	2,20	0,342
120	1,70	0,230
125	1,03	0,013



Z değeri ile gerçekçi bir örnek şöyle verilebilir: Bu örnekteki formül:
y= -0,0248x + 3,1609 şeklindedir. D değerinin 3 dk (0,477 log değeri) olması isteniyorsa bu formülde "y" yerine 0,477 yazılıp; 0,477= -0,0248x+3,1609 buradan x= 108,2 ºC olarak çözülür. Ya da 112 ºC'taki D değeri öğrenilmek isteniyorsa bu kez formülde x yerine 112 yazılıp buradan y= 0,3833 olarak hesaplanır. Bu logaritmik bir değerdir, logaritması 0,3833 olan sayı 2,417 dk (≅ 145 sn) şeklinde elde edilir.

D ve z değerleri asıl olarak gıda sanayisi uygulamalarında geçerlidir ve hammaddede ısıya en dirençli olan mikroorganizma türü için hesaplanır. Bu amaçla;

-Önce hammaddede (ve/veya gıda katkı maddelerinde) ısıl işleme en dirençli olan mikroorganizma belirlenir. Bu amaçla ılımlı bir pastörizasyon yapılarak (örneğin, 80 ºC'ta 5 dk) vejetatif hücreler öldürülerek sadece sporların canlı kalması sağlanır. Ardından PCA besiyerine 10^{-1} seyreltiden ekim yapılarak aerop ve anaerop koşullarda 37 ve 45 ºC'ta 24-48 inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda Petri kutularındaki koloni morfolojilerine göre ısıl işlem normu (sıcaklık ya da süre) yükseltilerek ısıya en dirençli olan sporlu bakteri izole edilir.

-Gıda sanayisinde nötr pH'lı et, süt ve sebze konserveleri için genellikle ısıl işleme en dirençli olanlar, aerop ve anaerop bakteri sporlarıdır. Düşük pH'lı ürünlerde ise genellikle ısıya dirençli küf sporları sorun yaratır.

-Bakteri, tryptic soy (CASO) broth gibi genel bir sıvı besiyerinde ön denemeleri yapılarak belirlenmiş optimum inkübasyon sıcaklığında (çok genel olarak aerop *Bacillus* spp. için 28-30 ºC, anaerop *Clostridium* spp. için 35-37 ºC) inkübe edilir ve aktif kültür uygun bir sporlandırma besiyerine sürülüp optimum koşullarda 15-18 gün inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda

besiyerinden toplanan (hasat edilen)[6] süspansiyon, hammadde (ve/veya katkı maddesine eklenir, standart yöntemle D ve z değerleri hesaplanır.

Hayali bir XYZ işletmesinde uzun süreli kontroller sonunda ABC türü mikroorganizmanın ısıya en dirençli olduğunu (uygulanan ısıl işlem için D_{118}= 1,5 dk) ve hammaddede ısıl işlem öncesinde 4,0 log KOB/mL düzeyinde olduğunu ve XYZ işletmesinin sadece 1 L ambalajlı UHT süt ürettiğini varsayalım. Buna göre her 1 L ambalajda 10^7 KOB/L bakteri olacaktır. Devamında XYZ işletmesi, kendi kalite standartlarına göre her onbin kutuda 1 adet bozulma olmasını kabul ettiğini de varsayalım.

-İşletme her 10000 kutudan 1 adedinde bozulmayı kabul ettiğine göre toplam 16,5 dk ısıl işlem sonunda istenilen kalite sağlanır. 16,5 dk şöyle hesaplanmıştır: Her kutuda 10^7 KOB/L (7 log KOB/ kutu) bakteri vardır. Hedeflenen indirgeme 10^{-4} KOB/L (-4 log KOB/ kutu).

F = (logA - logB) x D

A: mevcut mikroorganizma sayısı
B: ulaşılmak istenen sayı

F değeri, belirli bir ortamda belli sayıdaki belli bir mikroorganizmanın belirli bir sıcaklıkta ölmesi için geçen süredir ve birimi dakikadır. Buna göre:

F= [(7) - (-4)] x 1,5= (7+4) x 1,5= 16,5 dk.

İşletme, o gün gelen sütte daha fazla sayıda ABC türü olduğundan şüphe ederse ya sıcaklığı ya da süreyi artırarak aynı kaliteyi sağlayabilir.

05.10. Besiyerinin Kısmî Sterilizasyonu

Alışılmış bir tanımlama değildir. Örneğin VRB agar besiyerine sadece agarın eriyeceği kadar ısıl işlem uygulanır. Bu besiyerinin kimyasal bileşimi, refakatçi mikrofloranın büyük çoğunluğunun gelişimini baskılar. Agarın erimesi için uygulanan ısıl işlem, bu gibi besiyerlerinde gelişerek koloni oluşturabilecek refakatçi mikroflorayı tümüyle elimine eder. Böylece analiz sonunda Petri kutusunda gelişen tüm kolonilerin, analiz edilen numuneden geldiğine karar verilir. Otoklavlama bu gibi besiyerlerinin selektivitesini bozar.

[6] İnkübasyon sonrası agarlı besiyeri üzerine 5 mL steril saf su eklenir ve alkolde sterilize edilmiş 2- 3 cm uzunluğunda manyetik taş (balık) yerleştirilir. Manyetik karıştırıcıda yavaş hızda (~2 devir/ sn) karıştırılır ve tüm Petri kutusundaki koloniler bu şekilde sıvıya geçer. Steril bir Pastör pipeti kullanılarak bu süspansiyon Petri kutusundan ayrılır. Bu süspansiyondaki sporlu bakteri sayısı standart yöntemle belirlenmelidir.

06. LABORATUVAR

Doç. Dr. Hilal HALKMAN, Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

06.01. Genel Laboratuvar Bilgileri **154**
06.01.01. Genel Kurallar 154
06.01.02. Laboratuvar Cihazları 155
06.01.03. Laboratuvar Yerleşimi 161
06.02. Laboratuvar Güvenliği **162**
06.03. İzolasyon ve Tanımlama **167**
06.03.01. Saf Kültür Tekniği 168
06.03.02. İzolasyonda 1:100 Oranı 169
06.03.03. Selektif İzolasyon 169
06.03.04. Selektif Olmayan İzolasyon 171
06.03.05. Tanımlama (İdentifikasyon) 171
06.04. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler **175**
06.04.01. Morfolojik Testler 175
06.04.01.01. Basit Boyama 177
06.04.01.02. Gram Boyama 177
06.04.01.03. Hareket Testi (Asılı Damla) 178
06.04.02. Fizyolojik Testler 179
06.04.02.01. Gelişme Testleri 179
06.04.02.02. Hareket Testi (Besiyerinde) 180
06.04.03. Biyokimyasal Testler 181
06.04.03.01. İndol Testi 181
06.04.03.02. Metil Red Testi 183
06.04.03.03. Voges-Proskauer (VP) Testi 184
06.04.03.04. Eijkman Testi 184
06.04.03.05. Sitrat Testi 185
06.04.03.06. Malonat Testi 185
06.04.03.07. Asetamit Testi 186
06.04.03.08. Katalaz Testi 186
06.04.03.09. Oksidaz Testi 187
06.04.03.10. Karbohidrat Testleri 188
06.04.03.11. Bile Eskulin Hidroliz (Eskulin Hidroliz) Testi 190
06.04.03.12. Jelatini Sıvılaştırma Testi 191
06.04.03.13. Dekarboksilaz ve Dihidrolaz Testleri 191
06.04.03.14. Fenilalanin Deaminaz Testi 193
06.04.03.15. Double Sugar (Kligler) Iron Agar Testleri 193
06.04.03.16. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testleri 194
06.04.03.17. Üreaz Testi 195
06.04.03.18. β-Galactosidase (ONPG) Testi 195
06.04.03.19. Hidrojen Sülfür Oluşumu 196
06.04.03.20. SIM Medium Testleri 197

06.04.03.21. Koagülaz Testi 197
06.04.03.22. Deoksiribonükleaz (DNAse) Testi 198
06.04.03.23. CAMP Testi 199
06.04.03.24. Hemoliz Testi 200
06.04.03.25. Litmuslu Süt Testleri 200
06.05. Yıkama 201
06.06. Laboratuvarda Otokontrol 203
06.07. Kültür Koleksiyonu 207
06.08. Stok Takibi ve Analiz Ekonomisi 210
06.09. Tipik Laboratuvar Hataları 214
06.09.01. Genel Laboratuvar Hataları 214
06.09.02. Numune Hazırlanması ve Ekim Hataları 216
06.09.03. Besiyerlerinin Hazırlanmasındaki Hatalar 218
06.09.04. Testlerde Yapılan Hatalar 219
06.09.05. Değerlendirme Hataları 219
06.09.06. Eskimiş Standartlar/ Yönetmelikler 221

06.01. Genel Laboratuvar Bilgileri

06.01.01. Genel Kurallar

Bu kitabın farklı bölümlerinde zaman içinde standartların ve buna bağlı olarak kullanılan besiyerlerinin ve mikrobiyolojik kriterlerin değişebileceği uyarıları yapılmaktadır. Okuyucu, özellikle ulusal ve uluslararası standartlardaki güncellemeleri izlemelidir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı için aşağıdaki genel kurallara uyulmasının sağlanması gerekir. Devamında, laboratuvar güvenliği konusu (bknz ⇒ 06.02. ve 17. Laboratuvar Güvenliği bölümleri) tam olarak okunmalı, tüm laboratuvar personeli tarafından anlaşılmalı ve kesinlikle uygulanmalıdır.

-Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarına yetkili kişiler dışında hiç kimse giremez.

-Laboratuvardaki hava akımı, ekimlerde kontaminasyona (bulaşmalara) neden olur. Bu nedenle özellikle ekim sırasında laboratuvarda hava akımı olmamalıdır.

-Laboratuvarda klima kullanılıyorsa ekimden 15 dk önce kapatılmalıdır. Klima, özellikle 25-28 ^{o}C'ta çalışan inkübatörler için gereklidir.

-Laboratuvarda acil durumda kullanılmak üzere yeterli sayıda ve steril olmak üzere boş erlen, boş tüp, boş Petri kutusu gibi cam malzeme ile günlük kullanılan besiyerlerinden depolanabilenler hazır halde ve yedek olarak bulundurulmalı, her 15 günde bir bu malzeme yeniden hazırlanmalıdır.

-Laboratuvardaki cihazların kalibrasyonu düzenli olarak yapılmalı ve kalibrasyon kayıtları korunmalıdır.

-Analiz raporlarında inkübasyon sıcaklığı ve süresi yazılmalıdır. İnkübasyon, anaerobik ya da mikroaerofilik ortamda yapıldı ise mutlaka raporda belirtilmelidir.

-Kullanılmış tüm malzemenin nasıl sterilize edileceği, temizleneceği, yıkanacağı ya da atılacağı talimatlarla belirtilmelidir (bknz ⇒ 06.05. Yıkama bölümü).

-Laboratuvarda otokontrol uygulanmalı, belirli aralıklarla analizin doğru yapıldığı denetlenmelidir (bknz ⇒ 06.06. Laboratuvarda Otokontrol bölümü).

-Analiz raporlarının yazımında silinebilir kalemler (kurşun kalem vb.) kullanılmaz. Raporlar mutlaka dolma kalem, tükenmez kalem gibi silinemez kalemlerle yazılmalı, hatalı kayıt asla silinmemeli, üzeri çizilerek doğrusu yazılmalıdır. Elektronik ortamda tutulan kayıtlarda da benzeri uygulama yapılmalıdır. Elektronik ortamda güvenlik yeterince sağlanmalı, kayıtlar yeteri sıklıkla yedeklenmelidir. Laboratuvar kayıtlarının en az 2 yıl boyunca korunması gereklidir.

-9 Mart 2010 tarih ve 27516 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe girmiş olan "İyi Laboratuvar Uygulamaları Prensipleri, Test Birimlerinin Uyumlaştırılması, İyi Laboratuvar Uygulamalarının ve Çalışmaların Denetlenmesi Hakkında Yönetmelik" laboratuvarda bulundurulmalı, personelin bu yönetmeliği okuması, anlaması ve uygulaması sağlanmalıdır.

06.01.02. Laboratuvar Cihazları

Standart ve klasik yöntemle çalışan bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında bulunan temel cihazlar hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir.

Otoklav

Bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarının en önemli cihazlarının başında otoklav gelir. Temel görevi, basınç altında buharla sterilizasyondur. Farklı marka ve modellerde, değişik kapasitelerde ve şekillerde otoklavlar bulunmaktadır. Otoklavlanacak malzemenin özelliği, miktarı ve otoklavlama sıklığı gibi fonksiyonlar dikkate alınarak otoklav seçilmeli ve gerektiğinde laboratuvarda birden fazla otoklav bulundurulmalıdır.

Otoklavda sterilize edilecek besiyerleri ve çözeltiler ile kullanılmış ve yıkanmak üzere sterilize edilecek malzeme beraberce otoklavlanmamalı, tercihen bu iki amaçla iki 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 çıkışının olması havanın boşaldığının göstergesidir. Vakumlu otoklavlarda önce vakum yapılarak hava dışarı çıkarılır, sonra buhar verilir. Böylece otoklav içinde hava kalmaması sağlanır. Hangi tip otoklav kullanılırsa kullanılsın, otoklavda hava kalırsa yeterli sterilizasyon sağlanamaz.

Otoklav aşırı doldurulursa kalacak hava cepleri de sterilizasyon performansını düşürür.

Mikrobiyoloji laboratuvarında hatalı kullanıldığı için sahte pozitif ya da 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 kaldığı için besiyeri performansı azalır. Besiyerlerinin sterilizasyonu için kullanılacak otoklav çabuk ısınıp normal sürede soğutulmalıdır. Otoklav içi sıcaklığının doğruluğu ise tercihen termokopul ile test edilmelidir.

Otoklav etkinliğinin kontrolü için çeşitli markalara ait otoklav bantları vardır. Ancak biyolojik indikatörlerin kullanılması esastır (bknz⇒ 05.07. Sterilizasyon Kontrolü bölümü).

İnkübatörler

Laboratuvarın çalışma yüküne ve amaçlarına göre farklı sıcaklıklarda çalışan (20-22 ºC; 25-28 ºC; 35-37 ºC; 44 ºC; 55 ºC vb.), farklı büyüklüklerde, standart, anaerobik (vakumlu veya karbondioksitli), soğutmalı, çalkalamalı gibi çeşitli özelliklerdeki inkübatörler mikrobiyoloji laboratuvarının önem sırası açısından önde gelen cihazları arasındadır. Küf analizinde Petri kutularının 4-5 gün süre ile inkübatörde kalacağı göz önüne alınarak inkübatör kapasitesi seçilmelidir.

Mikrobiyoloji laboratuvarında inkübatörler, prensip olarak kurutma amacı ile kullanılmamalıdır. Günlük analiz yapılan inkübatörlerde sıcaklık dalgalanması en fazla ±1 ºC olmalıdır. Gelişme sıcaklığına göre (44,5 ºC, 15 ºC vb.) tanımlama yapılan analizlerde mikroişlemci kontrollü su banyosu tercih edilmekle birlikte hava inkübatörü kullanılma zorunluluğu varsa ±0,2 ºC sıcaklık dalgalanması olan inkübatörler tercih edilmelidir.

İnkübatörlerin aşırı doldurulmasından kaçınılmalı ve yerleştirmede hava sirkülasyonu sağlanacak şekilde boşluklar bırakılmalıdır. Petri kutuları ve tüpler inkübatörün yan duvarlarından 25 mm boşluk kalacak şekilde yerleştirilmelidir. İnkübatöre, üst üste 6 adetten fazla cam Petri kutusu ve 10 adetten fazla plastik Petri kutusu konulmamalıdır.

İnkübatörün sıcaklık değişimi düzenli olarak kontrol edilmelidir. Bu konuda laboratuvar kayıtlarında bulunması gereken uygulama, inkübatörün alt ve üst rafında bulunan su dolu bardak ya da erlen veya beher içindeki termometre ile sabah ve akşam inkübatör sıcaklığının ölçülmesidir. Devamında gece elektrik kesilmesi ve sıcaklığın düşmesi riskine karşı minimum-maksimum termometre kullanılması önerilmektedir. Termometrelerin doğru ölçüm yaptığı, referans termometreler ile düzenli olarak kontrol edilmelidir. Elektrik kesilmelerine karşı inkübatörlerin sürekli güç kaynağı ile beslenmesi önerilir.

Laboratuvarın çalışma düzeni inkübatörün kapağını en az süre ile açık tutacak şekilde planlanmalıdır. İnkübatörlere doğrudan güneş ışığı gelmesi önlenmeli, düzenli olarak temizlik ve dezenfeksiyon yapılmalıdır.

Su Banyoları

Özel çalışmalarda inkübasyon ortamı sağlamak amacıyla laboratuvarda standart, çalkalamalı ve mikroişlemci kontrollü su banyoları kullanılmaktadır. Su banyolarında kullanılan su, sürekli olarak yenilenmeli, düzenli olarak temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidir. 44,5±0,2 ºC gibi özel inkübasyon koşullarının sağlanması için kullanılacak su banyoları, mutlaka termostatik kontrol ünitesine sahip olmalı ve termostatik kontrol ünitesinden bağımsız çalışan ayrı bir termometre ile su sıcaklığı kontrol edilmelidir. Elektrik kesilmelerine karşı su banyolarının sürekli güç kaynağı ile beslenmesi önerilir.

Laboratuvardaki standart su banyoları, otoklav çıkışında agarlı besiyerinin katılaşmadan korunmasında kullanılabilir, ancak asla donmuş agarlı besiyerinin eritilmesinde kullanılmamalıdır. Donmuş agarlı besiyerini eritmek için 85-90 ºC sıcaklık gerekir ve standart su banyoları bu sıcaklıklarda kullanılmaya zorlanırlarsa zamanla duyarlıklarını yitirirler. Agarlı besiyerlerini eritmek için kullanılan kaynar su banyoları farklıdır.

Etüv (Kuru Hava Sterilizatörü; Pastör Fırını)

Yıkanmış cam malzemenin kurutulması için 50-60 ºC'ta çalışan bir etüve, cam ve metal malzemenin sterilizasyonu için ise 180 ºC'ta çalışan bir etüve gerek vardır. Sterilizasyon amaçlı etüv, laboratuvar iş yüküne uygun planlama ile 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.

Kuru hava sterilizatörlerinde sıcaklık dağılımı yüksektir. Dolayısı ile bunlar inkübatör olarak kullanılmamalıdır.

Saf Su Cihazı

Eski tarihli mikrobiyoloji laboratuvar kitaplarında temiz bir dere suyunun besiyeri hazırlamada kullanılabileceği yazılıdır. Bu bilgi, çok muhtemelen, dere sularının çok temiz olduğu tarih ve mekânlar ile *E. coli* gibi kolaylıkla gelişebilen bakteriler için geçerlidir.

Besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılacak suyun kimyasal özellikleri 04.04.01. bölümde verilmiştir.

Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılacak su, farklı amaçlarla farklı cihazlardan elde edilebilir.

-Deiyonizatör: Reçineli sistemlerden elde edilen deiyonize su, gelişmesi zor olmayan ve stres altında olmadığı bilinen mikroorganizmaların analizinde

kullanılabilir. Devamında bu sular, yıkanmış cam malzemenin en son çalkalanması amacıyla da kullanılabilir. Bu sistemlerde düzenli temizleme ve rejenerasyon yapılmalıdır.

-Eski model metal damıtma su cihazları: Bakır sistemlerin kullanıldığı eski model damıtma sistemlerinden elde edilen damıtık sular, bakır iyonlarının suya karışma olasılığına karşı özellikle zor gelişen ve/veya stres altındaki mikroorganizmaların analizinde uygun değildir.

-Yeni model metal damıtma su cihazları: Paslanmaz çelik kullanılan yeni modellerde bakır iyonu endişesi yoktur. Zor gelişen ve/veya stres altındaki mikroorganizmaların analizinde de kullanılabilir. Cam sistemlere kıyasla en büyük avantajı, damıtma sırasında soğutma suyunun daha az kullanılmasıdır.

-Standart cam damıtma su cihazları: Diğer sistemlere kıyasla çok miktarda soğutma suyu kullanımı nedeni ile kullanımı giderek azalmaktadır. Özellikle zor gelişen ve/veya stres altındaki mikroorganizmaların analizine uygundur.

-Ultrafiltrasyon sistemleri: Suyun fiziksel olarak tüm yabancı iyonlardan arındırıldığı sistemlerdir. Sistemde soğutma suyu gereksinimi yoktur ve çok yaklaşık olarak giren su miktarı kadar saf su elde edilir.

Hassas Terazi

Standart gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında ±0,01 g hatta ±0,1 g duyarlıktaki hassas terazi yeterlidir. Teraziler kolaylıkla temizlenebilir modellerden seçilmelidir. Hassas terazi, laboratuvarda titreşimlerden arındırılmış, düzgün bir yere konulmalı, hassas terazinin bulunduğu tezgâhta çalkalamalı su banyosu, homojenizatör vb. cihazlar olmamalıdır. Hassas terazinin yeri değiştirilmemeli, haftada en az bir kez standart ağırlık ile (örneğin, darası alınmış balon jojeye saf su konularak) kontrol edilmeli, standart ağırlık ile ölçülen ağırlık arasında fark varsa yetkili servise başvurulmalı ve yılda en az bir kez yetkili servis tarafından kalibrasyon yapılmalıdır.

pH metre

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

pH metre elektrodu, zaman içinde duyarlığını yitirir. Dolayısı ile laboratuvar tarafından belirlenecek sıklıkla (en geç haftada bir kez) standart test çözeltileri ile kontrol edilmeli ve sonuçlar laboratuvar defterine kaydedilmelidir.

Patojenler ile çalışılırken pH metre elektrodu, ölçüm sonrasında dezenfekte edilmelidir. Bu amaçla en yaygın olarak alkol kullanılmakla beraber alkol pH metre elektrodundaki membrana zarar verir. Konu üzerinde üretici firmanın önerisi dikkate alınmalıdır. Yoğun protein içeren çözeltilerin/ besiyerlerinin pH ölçümlerinde de elektrot duyarlığı zayıflar. Proteolitik enzimler kullanılarak

elektrot rejenere edilebilse dahi bu konuda da üretici firma önerisi dikkate alınmalıdır. pH metre elektrodu, kullanılmadığı süre içinde 3 mol KCl[1] çözeltisinde tutulmalıdır.

Karıştırıcılar/ Homojenizatörler

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

Katı numunelerin homojenizasyonunu yapmak için çok farklı sistemler ve cihazlar bulunmaktadır. Bu cihazlar başlıca steril torbalı peristaltik homojenizatörler (stomacher) ve rotary homojenizatörler (blender) olarak iki grupta toplanır.

Aşılama Kabinleri

Analiz edilecek ürüne dışarıdan toz ve mikroorganizma bulaşmasını önlemek amacıyla kullanılan kabinlerdir. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında kullanılan aşılama kabininde 1 m^3 havada 4000'den fazla toz partikülü bulunmamalıdır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında düşey tip (vertikal) aşılama kabini (laminar air-flow, 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 (örneğin plate count agar) kapağının açık bırakılması ve çalışma sonunda bu Petri kutusunun kapağı kapatılarak inkübasyona bırakılması ile kabindeki mikroorganizma yükü kontrol edilebilir.

Çok genel olarak aşılama kabinleri analiz güvenliğini sağlayan, çevre güvenliğini sağlayan ve çalışanın güvenliğini sağlayan olmak üzere üç grupta incelenebilir. Standart bir mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak kullanılanlar analizin güvenliğini sağlayan gruptadır. Basit olarak dışarıdan filtre edilmiş hava kabin içine verilir. UV lambalar ile kabin içinde önceden bir dezenfeksiyon sağlanabilir. Bu tip kabinlerde kabinden gelen hava dışarı (çalışana) doğru üflenir. Gelişmiş modellerde hava dışarı doğru değil dik olarak sirküle edilir ve çalışan da korunmuş olur.

Çevreyi koruyan kabinler daha çok viroloji ve mikoloji laboratuvarlarında kullanılır. Burada esas olan çalışma sırasında küf sporları ve virüslerin kabin içinden dışarı çıkartılmamasıdır. Buna göre hava dışarıdan emilir ve filtre edildikten sonra kabin dışına verilir. Bu tip kabinlerde küf sporları ve virüsleri tutacak özellikte filtreler kullanılır.

Eldivenli kabin (glove box), patojen laboratuvarlarında başta çalışanların korunması olmak üzere ortamın kontamine edilmemesi amacı ile kullanılan özel bir aşılama kabinidir. Basit olarak çalışan kişi tümüyle kapalı bir kabinde

[1] 3 mol KCl hazırlamak için 223,5 g KCl bir miktar saf suda çözdürülüp saf su ile 1 litreye tamamlanır.

kabinin bir parçası olan eldivenleri giyerek çalışır. Zorunlu anaeroplar ile çalışılırken de bu tip kabinler kullanılır.

Standart kabinlerde en önemli sorunlardan birisi Bunsen beki kullanılmasıdır. Kabin içinde steril hava akımı ile sağlansa dahi, öze ile tüpten Petri kutusuna sürme yapılması gibi basit bir uygulama öncesi ve sonrasında özenin bir şekilde sterilize edilmesi gerekir ve bu aşamada en makul çözüm Bunsen beki kullanımıdır.

Ancak hava üfleme sırasında Bunsen beki alevinin dağılması, alevin kabinin tavanına zarar vermesi gibi olumsuzluklar da vardır. Metal özelerin sterilizasyonu için alternatif olarak mikroinsineratör de kullanılabilir.

Mikroinsineratör, iç sıcaklığı ~1000 ºC, ancak dış sıcaklığı ~30 ºC olan özel bir cihazdır. Bu cihaz kullanıldığında plastik saplı özelerin zarar göreceği ve tek kullanımlık plastik özelerin bu cihazda sterilize edilemeyeceği açıktır. Bu cihazın kullanımı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından tavsiye edilmektedir.

Otomatik Pipet

Cam pipetlerin yıkanması ve sterilizasyonundaki zaman kaybı, cam pipetlerin kırılganlığı, ağızla pipetlemeden kaçınılması vb. nedenlerle mikrobiyoloji laboratuvarlarında steril ve tek kullanımlık (disposal) uçlar ile otomatik pipetlerin kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır.

Bu pipetlerde en büyük sorun, pipet ana gövdesinin kontaminasyonudur. Kullanım hatasına bağlı olarak hızlı çekim sırasında ana gövde, çalışılan materyaldeki farklı türlerdeki mikroorganizmalar ile bulaşmakta, yeni uç olsa da tekrarlanan hata ile hızlı çekim sırasında yeni analiz materyali önceki materyal ile çapraz olarak kontamine olmaktadır.

Otomatik pipetlerin kullanımı konusunda laboratuvar personeline teknik eğitim verilmeli ve her analiz öncesinde bu pipetler alkol ya da başka bir dezenfektanda tutularak dezenfekte edilmelidir. Dezenfeksiyon kuralları, laboratuvar yönergelerinde (talimatlarında) açık bir şekilde belirtilmeli ve dezenfektan üreten firmanın ilgili önerilerine uyulmalıdır. Bu pipetlerin kalibrasyonu ihmal edilmemelidir.

Diğer Cihazlar

Laboratuvarın işlevine göre yeterli niteliklerde mikrodalga fırın, mikroskop, santrifüj, vakum pompası, membran filtrasyon seti, soğutucular (buzdolabı ve/ veya derin dondurucu), UV el lambası, spiral plater, koloni sayıcı, çalkalayıcı, 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 cihazları, immünomanyetik separasyon cihazı, PCR, tanımlamaya yönelik cihazlar vb. donanım da bulunmaktadır.

06.01.03. Laboratuvar Yerleşimi

Bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarının en önemli kurallarından birisi, ayrı bir ekim odası bulunması gerektiğidir. Ekim odası genel ve basit olarak ana laboratuvar bölmesinden cam ya da uygun bir materyalle ayrılmış bir bölme şeklinde kurulabilir. Eğer mikrobiyolojik analizlerin yapıldığı alan, genel laboratuvar içinde ise böyle bir bölme olması zorunludur. Laboratuvar sadece mikrobiyoloji amaçlı kullanılıyor ve laboratuvarda sadece mikrobiyoloji uzmanları ve teknisyenleri çalışıyor ise ayrı bir ekim odasına gerek duyulmayabilir. Hiçbir koşulda starter kültür üretilen laboratuvar ile istenmeyen ve özellikle patojen mikroorganizmaların analizinin yapıldığı laboratuvar aynı alanda olamaz. Bunlar fiziki yerleşim ve personel olarak tümüyle iki ayrı 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 ve tezgâhlar rahatlıkla temizlenebilecek şekilde düzgün olmalı, deterjan ve dezenfektanlardan etkilenmemelidir.

-Mikrobiyoloji laboratuvarının fiziki ölçüleri yapılan analiz yoğunluğuna göre değişir. En küçük olarak 3x6 m alan olmalıdır. Yükseklik ise çeker ocak ve aşılama kabini gibi sistemler için en az 3 m'dir. Bir yaklaşıma göre, her çalışan için 20 m^2 alan gerekir.

-Laboratuvarda toz bulunmamalı, fiziki yerleşimde buna dikkat edilmelidir. Bu amaçla laboratuvar tezgâhları, cihazlar ve mobilyaların toz tutma yüzeyleri az olmalı, her yer rahatlıkla temizlenebilmeli, dolaplar tavana kadar yapılmalı, laboratuvar tezgâhlarının tabanı ve dolaplar döşemeden rahatlıkla temizlenebilecek kadar yüksekte (~20 cm) olmalıdır.

-Havalandırma; nem ve sıcaklığı kontrol edecek, laboratuvara taze hava sağlayacak şekilde yapılmalıdır. Pencereden sağlanan doğal havalandırma son yıllarda yerini mekanik havalandırmaya bırakmıştır. Bu şekilde, gerektiğinde ısıtma ve soğutma yapılabilir, basit ve ucuz önlemler ile içeriye verilen hava filtre edilerek en azından tozlanmanın önüne geçilebilir. Patojenler ve/veya özellikle küflerle çalışılan laboratuvarlarda dışarı atılan havanın da filtre edilmesi gerekir. Çalışma anında laboratuvar kapı ve pencereleri kapalı tutulmalı, ancak kapılar asla kilitlenmemelidir. Açılabilen pencerelerde mutlaka sinek teli bulunmalıdır. Laboratuvar sıcaklığı, çalışmaya uygun olmalıdır.

-Laboratuvarda yeterli sayıda elektrik prizi, su musluğu, eviye, gaz ve gerekli ise basınçlı hava musluğu bulunmalıdır. Muslukların (su, basınçlı hava ve gaz)

ayrıca basit açma/ kapatma vanaları, prizlerin sigortaları olmalıdır. Gerektiğinde elektriğin, gazın, basınçlı havanın ve suyun ivedilikle ve basit olarak kapatılabileceği önlemler alınmalıdır. Borular (su, gaz vs.) açıkta olmamalıdır.

-Laboratuvara doğrudan güneş ışığının girmesinden kaçınılmalıdır. Gün ışığına yakın ışık veren floresan lambalar tercih edilmeli ve 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. UV ışığının gözlerde körlük ve deride kanser yapabileceği unutulmamalıdır. Dolayısı ile UV lambalarına kumanda eden anahtar oda dışında bulunmalı, lamba açık iken dışarıda uyarı ışığı yanmalı, lamba açık iken kapı açılırsa UV lambanın otomatik olarak kapatılma sistemi kurulmalıdır.

-Otoklav ve yıkama odası, tercihen mikrobiyoloji laboratuvarının 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.

06.02. Laboratuvar Güvenliği

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

Bu bölümde, mikrobiyoloji laboratuvarına yönelik olmak üzere çalışanların sağlık riskleri verilmiştir. Dolayısı ile bu bölüm sadece gıda mikrobiyolojisi değil klinik, veteriner ve çevre mikrobiyolojisi laboratuvarlarına da yöneliktir. Ayrıca 17. Laboratuvar Güvenliği bölümünde konu üzerinde profesyonel yaklaşım ile bilgilendirme yapılmıştır.

Mikrobiyoloji laboratuvarında güvenlik, genel laboratuvar güvenliği kuralları üzerine kurulmuştur. Türkçe olarak kolaylıkla sağlanabilecek kaynaklardan genel laboratuvar güvenliği kuralları da okunmalı, tam olarak anlaşılmalı ve kesin olarak uygulanmalıdır. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Tüketici Güvenliği ve Halk Sağlığı Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı tarafından hazırlanmış Laboratuvar Güvenliği El Kitabı, Ankara-2017 künyeli dosya,

https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuketici-guvenligi-halk-sagligi-lab-db/Baskanligimiz_Laboratuvarlari/Laboratuvar_Guvenligi/Labaoratuvar_Guvenligi.pdf adresinden ücretsiz ve şifresiz olarak bilgisayara indirilebilir. Ayrıca başta http://www.laboratuvarguvenligi.com/ olmak üzere laboratuvar güvenliğine ilişkin pek çok yararlı kaynak bulunmaktadır.

Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışanlar, öncelikle kendilerini laboratuvardaki mikroorganizmalardan korumak zorundadırlar. Çalışılan materyalin "mikrop"[2] olduğu asla unutulmamalıdır. Tüm laboratuvar personeli bu konuda eğitim görmüş olmalıdır. İşlenmemiş, en az (minimal) düzeyde işlenmiş ya da işlem teknolojisi gereği tekrar bulaşmaya açık olan gıdalarda patojen bakteriler bulunabilir. Patojenite, öncelikle mikroorganizma türü ve serotipi ile vücuda giren sayıya bağlıdır. Bunlara ek olarak hastalıkların ortaya çıkmasında başta kişisel sağlık durumu olmak üzere pek çok etken daha vardır.

Açıkta satılan bir gıdanın üzerindeki patojen bir bakteri, sağlıklı bir insanı hastalandırmaya yetecek sayıda olmayabilir. Ancak laboratuvardaki analiz sırasında bu bakterinin sayısının milyarlara erişeceği de açıktır.

Mikrobiyoloji laboratuvarı tehlikeli bir yerdir. Patojenler ile çalışanlar arasındaki bariyer çoğu defa ve sadece bir Petri kutusunun kapağı ya da bir tüpün ve erlenin pamuğudur.

Primer ve fırsatçı patojenlerin dışında saprofitlerin de yüksek sayılarda var olduklarında hastalıklara neden olabileceği ve özellikle küflerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerini uzun dönemde gösterebileceği gibi faktörler de dikkate alındığında tehlikenin boyutlarının daha da arttığı görülür.

Tüm bu tehlikelere karşı basit kurallara uyulması ile risk, kolaylıkla kabul edilebilir boyuta indirilmektedir. Laboratuvardaki temel hijyen önlemleri öncelikle çalışanın sağlığını korumaya yöneliktir.

Mikrobiyoloji laboratuvarı personeli, kişisel sağlığına özel önem göstermelidir. Basit olarak soğuk algınlığı kişisel direnci düşürür. Bu durumdaki kişinin laboratuvarda hata yapma olasılığı artar. Buna bağlı olarak gerek kendisi gerek yakın çevresi daha büyük tehdit ile karşılaşır. Fırsatçı patojenler de dikkate alındığında durum farklı bir boyuta erişir.

Gebelik, risk grubu yüksek olarak tanımlanan dört ana gruptan birisidir. Gebe olan ya da gebelik olasılığı var olan kişiler mikrobiyoloji laboratuvarında çalışmaması gerekir. *Listeria* analizlerinde gebe olan ya da gebelik olasılığı var olan kişilerin bu analizlere katılmama hakkı gelişmiş toplumlarda korunmuştur. FDA tarafından en yüksek risk grubu, henüz gebe olduğunu bilmeyen kadınlar olarak tanımlanmaktadır.

[2] Mikrop, basitçe mikroorganizmanın kısaltılmış şeklidir, ancak tüm dillerde kötü, istenmeyen, tehlikeli anlamında kullanılmaktadır. Bu cümlede, "mikrop" kelimesi özellikle bu vurgulamayı yapmak için kullanılmıştır.

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

-Laboratuvar personelinin ilk öğrenmesi ve asla unutmaması gereken husus, en tehlikeli olan analizin toplam mezofil koloni sayımı gibi analizler olduğudur. Yapılacak analiz örneğin, *E. coli* O157:H7 ise personel tehlikenin farkındadır ve daha dikkatli olur. Ancak toplam mezofil aerobik koloni analizinde Petri kutusunda oluşan koloniler arasında *E. coli* O157:H7 olmadığını hiç kimse garanti edemez. En tehlikeli olan "bilinmeyendir".

-Laboratuvarda hiçbir yerde (ofis masaları, soyunma dolapları ve özellikle buzdolabı) analiz numuneleri dışında tüketim amaçlı gıda maddesi kesinlikle bulunamaz. Laboratuvar sorumlusu bu konuda gereken önlemi almalıdır.

-Laboratuvarda kesinlikle hiçbir şey yenilmez ve içilmez. Bunun tek istisnası, örneğin kalp hastaları tarafından acil durumda kullanılacak dilaltı gibi ilaçlardır. Personel içinde bu gibi hastalıkları olan ve acil durumda ilaç kullanması gereken kişiler varsa bu kişilerin kullanacağı ilaçlar, laboratuvardaki ilk yardım dolabında tutulmalı, bu ilaçların 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 tuvalet) 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 laboratuvarda en az bir adet yedek temiz önlüğü bulunmalıdır. Laboratuvarda giyilen önlük ve kullanıyor ise bone ve galoş ile hiçbir koşulda laboratuvar dışına çıkılmaz.

-Personel, kişisel temizliğe dikkat etmek zorundadır. Tırnaklar kısa kesilmiş olmalı, saçlar uzun ise bağlanmalıdır. Saçların bağlanması hijyen dışında Bunsen beki alevinde yanma tehlikesini de azaltır. Aynı tehlike nedeni ile saçların başörtüsü ile kapatılması önerilmez. Başörtüsü kullanılacak ise bunun kolay alev almayan kumaştan yapılmış olanı tercih edilmelidir. Saçların alev alması durumunda önlüğün etekleri ile alevin boğularak söndürülmesi etkili bir yöntemdir. Laboratuvarda bu konuda tatbikat yapılmalıdır.

-Laboratuvarda yangın söndürücü varsa hangi tip olduğu, nasıl kullanılması gerektiği personele öğretilmeli ve tatbikat yapılmalıdır. Başörtüsünün alev alması ve panik sonucu yangın söndürücünün yanlış kullanılması nedeniyle bir stajyer öğrencinin öldüğü unutulmamalıdır.

-Laboratuvarda grip ve nezle benzeri hastalıklara yakalanmış personel, özel koruyucu maske ile ve özellikle ellerinde kesik ve/veya yara olan personel

eldiven ile çalışmalıdır. *Cl. perfringens*, açık yaradan girerse gazlı kangrene neden olur. Bu gibi tehlikeler personele mutlaka öğretilmelidir.

-Özellikle patojenler ile çalışıldığında pamuklu olsa dahi pipetler asla ağızla çekilmemeli, puar ya da otomatik pipet/ pipetör kullanılmalıdır. Patojen ya da ne olduğu bilinmeyen bir bakteri kültürünün ağza gelmesi koşulunda derhal tükürülmeli, ağız %76'lık etil alkolle kuvvetlice çalkalanıp gargara yapıldıktan sonra hemen en yakın sağlık merkezine başvurulmalıdır. Patojen ya da ne olduğu bilinmeyen bir bakteri kültürünün yutulması durumunda derhal kusulmalı ve en yakın sağlık merkezine başvurulmalıdır.

-Laboratuvarda ilk yardım dolabı bulunmalı ve personele en sık rastlanan kesilme, yanma gibi kazalarda ne yapması gerektiği konusunda eğitim verilmeli, tatbikat yapılmalıdır.

-Palto, mont, hırka ve çanta benzeri kişisel malzeme, tercihen laboratuvar dışında bırakılmalı, laboratuvar düzeni açısından bunların laboratuvarda bulunmasında zorunluluk varsa kapalı dolaplarda korunmalıdır. Laboratuvar hijyeni 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 atılmalıdır.

-Sabah işe gelindiğinde öncelikle çalışma tezgâhları dezenfekte edilmeli, her çalışmanın bitiminde tezgâhlar tekrar dezenfekte edilmelidir. Dezenfeksiyonda ticari olarak pazarlanan pek çok dezenfektan kullanılabilir. Laboratuvara her giriş ve çıkışta özellikle eller dezenfekte edilmelidir. Farklı ticari kuruluşlar tarafından tezgâh, ambalaj vb. yüzeylerin dezenfeksiyonu için çok farklı formüller sunulmaktadır. Uluslararası pazarda geçerliği kanıtlanmış olan ticari kuruluşların sunduğu ürünler güvenilirdir. Burada ön koşul, önerilen formülasyonun (derişim ve uygulama süresi) kullanım şekline tam olarak uyulmasıdır. Tüm personelin bu konuda eğitim alması gereklidir.

-Mikroorganizma içeren materyalin kırılması ve/veya mikroorganizma kültürünün dökülmesi durumunda karantina uygulanmalı, mikroorganizma dökülen yer ve bu yerin hemen üzerindeki hava dezenfekte edilmelidir. Dezenfeksiyon ve kırılmış malzemenin toplanmasında eldiven ile çalışılmalıdır. Havanın dezenfeksiyonu için aerosol etkili sistemler kullanılmalıdır. Dezenfeksiyon işlemi bittikten sonra dezenfeksiyonu yapan kişilerin eldivenleri ve önlükleri sterilize edilmelidir. Laboratuvarda bu gibi kazalara karşı gerekli malzeme her zaman hazır olarak bulundurulmalıdır. Laboratuvar güvenliğine yönelik hazır ticari kitler kullanılabilir. Olası bir kazaya karşı personelin önceden tatbikat yapması önerilmektedir.

-Laboratuvarda çatlamış ve kırık cam malzeme olmamalıdır.

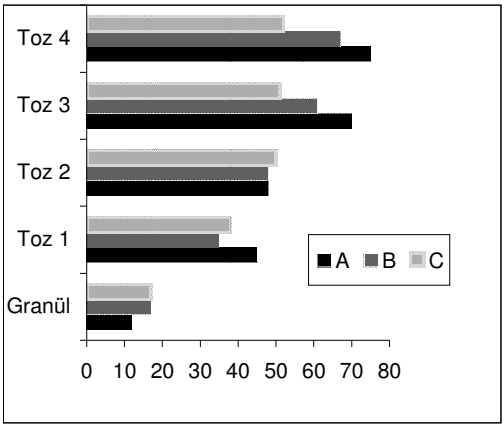
Dehidre besiyerleri, higroskopik (nem çekici) özelliktedir. Dolayısı ile besiyeri kutusu ağzının sıkı bir şekilde kapatılmış olarak kuru yerlerde depolanması

gerekir. Besiyeri kutusu ilk açıldığında üzerine açım tarihi yazılmalı ve hiçbir koşulda aynı besiyeri çeşidinden aynı anda birden fazla kutu açılmamalıdır. Besiyeri kutularının açılmasında "ilk giren ilk çıkar" kuralına titizlikle uyulmalı ve ilgili kayıtlar düzenli tutulmalıdır.

Granül yapıdaki besiyerlerinin tartımı sırasında toz bulutu oluşumu "toz besiyerleri" ile karşılaştırıldığında yok denecek kadar azdır. Bu durum, deneysel olarak da gösterilmiştir. Bütün markalara ait dehidre besiyerleri içinde insan sağlığına kayda değer ölçüde zararlı olan bileşenler bulunabildiği gibi en azından aşırı higroskopik (nem çekici) olmasına bağlı olarak besiyerinden çıkan toz bulutunun solunması ciğerlere zarar verebilir.

Zararlı bileşikler içinde safra tuzları (bile salts), brilliant green, fuchsin, malachite green, selenite, tetrathionate, tergitol, lithium chloride, acriflavine, cycloheximide, sodium azide, thiocyanate, kanamycine, chloramphenicol, rose bengal ve dichloran en sık rastlanılanlar arasındadır. Bunlar, farklı şekillerde ve farklı sürelerde insan sağlığına zarar veren bileşiklerdir (bknz ⇒ 04.11 Tehlikeli Maddeler bölümü).

Aşağıda (Şekil 06.01) farklı markalara ait dördü toz ve biri granül olan üç farklı besiyerinin (A: VRB agar, B: Baird-Parker agar, C: MacConkey broth) tartımı sırasındaki toz dağılımı görülmektedir.



Şekil 06.01. Tartım sırasında havada toz dağılımı

Tartım sırasında oluşan toz bulutunun bir miktar solunması ile oluşan zararların büyük bir bölümü (örneğin, bazı alerjik reaksiyonlar) uzun zaman içinde görülür, bir diğer deyişle sağlığa yönelik bazı olumsuz etkiler ileride ortaya çıkar.

Yapılan çalışmalar, besiyeri çeşidine bağlı olarak değişmek üzere tartım sonrasında oluşan toz bulutu granül besiyerinde sadece 10-18 birim iken diğerlerinde 33-75 birim arasında olduğunu göstermiştir. Ancak asıl fark granül ve toz besiyerleri arasındadır.

Söz konusu üç besiyeri içinde gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında en çok kullanılanın VRB agar olduğu açıktır. Söz konusu toz besiyerlerinde tartım sırasında en fazla toz bulutu oluşturanın da VRB agar olduğu görülmektedir. Bu durumda granül yapıdaki besiyerinin diğer tüm üstünlükleri önemsenmese bile sadece laboratuvar personelinin sağlığı açısından önemi açıktır.

Biyogüvenlik

Mikrobiyoloji laboratuvarında yönetmelik ve talimatlara her zaman uyulmalıdır. Tehlikeli ve hastalık yapıcı test suşları ve bunları bulundurabilecek numuneler ile çalışılan her türlü mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanan tüm işlemler, şüpheli mikroorganizmaların biyogüvenlik düzeylerine göre yapılmalıdır. Biyogüvenlik açısından dört düzey vardır:

-Biyogüvenlik Düzeyi 1: Yetişkin insanlarda her zaman hastalık yaptığı kanıtlanmamış/ kayıtlara geçmemiş mikroorganizmalar ile çalışmak. Örnek: *Serratia marcescens.*

-Biyogüvenlik Düzeyi 2: İnsan hastalıklarıyla geniş çapta ilişkili, ancak sıçrama veya havaya karışarak solunum yolu ile enfeksiyon yaptığı kanıtlanmamış/ kayıtlara geçmemiş mikroorganizmalar ile açık tezgâh üzerinde çalışmak. Örnek: *Salmonella* spp.

-Biyogüvenlik Düzeyi 3: Solunumla bulaşma potansiyeli olan ve potansiyel olarak ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu açıkça bilinen mikroorganizmalar ile çalışmak. Bu gibi mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda biyolojik güvenlik kabini kullanılmalıdır. Örnek: *Mycobacterium tuberculosis.*

-Biyogüvenlik Düzeyi 4: Hava ile bulaşabilecek, çok tehlikeli ve aşısı ya da tedavisi olmayan ajanlarla çalışmak. Özel ekipman ve düzenekler gerekir. Örnek: Crimean-Congo hemorrhagic fever (Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi).

Buna göre "standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı" biyogüvenlik düzeyi "2" olarak ele alınmalı, ancak tehlikenin boyutu asla küçümsenmemelidir. Analiz edilecek gıda numunesinde havadan bulaşabilen tüberküloz etmeni gibi tehlikeli bir mikroorganizma bulunmadığı kesin değildir.

06.03. İzolasyon ve Tanımlama

Mikroorganizmalar, doğada çok genel olarak karışık flora halinde bulunurlar. Bazı fermente süt ürünleri ve bira gibi tek starter kültür kullanılarak yapılanlar hariç olmak üzere gıdalarda da karışık mikroflora halinde bulunan farklı mikroorganizmaların saf olarak elde edilmesi işlemine izolasyon denir.

İzolasyonda her koşulda katı besiyeri kullanılır, amaç koloni elde etmektir. Koloni, agarlı besiyerinde tek bir hücreden çoğalmış bir topluluk olduğu için saf kültür olarak tanımlanır.

06.03.01. Saf Kültür Tekniği

Tanımlanacak kültürün saf olarak elde edilmesi tanımlama testlerine geçmeden önceki en önemli aşamadır. Bir diğer deyiş ile saf kültür elde edilmesi tüm tanımlama testleri öncesinde yapılmış olmalıdır. Saf olmayan (karışık, bulaşmış) bir kültürde tanımlama yapılamayacağı gibi bazen bu şekilde elde edilebilecek hatalı sonuçlar önemli ekonomik kayıplara ya da klinik mikrobiyolojide yanlış tedavi uygulamalarına da neden olabilir.

Saf kültür, standart bir Petri kutusundaki katı besiyerinde gelişen koloniden elde edilir. Buna izolat[3] denilir. Saf kültür elde etmek amacıyla yapılan izolasyon sırasında izole edilecek koloninin yakın çevresinde başka koloni olmamalı, izolasyon güvenli bir şekilde yapılmalıdır.

İzolasyonda öze kullanılacak ise kısa saplı olanların tercih edilmesi gerekir. Bunun nedeni el ile daha rahat kullanılabilmesi ve sadece istenen noktaya dokundurma kolaylığıdır. Yaklaşık 5 cm boyunda, boş küçük tüplere ayrı ayrı olmak kaydı ile Japon tipi olarak bilinen kürdan koyulup pamuklanarak otoklavlanması ile de iyi bir izolasyon gereci elde edilir. Sterilize edilmiş kürdan, tüpten çıkartılır, koloniye değdirilir, içinde 2 mL kadar besiyeri bulunan kısa tüplerin içine bırakılır.

Kürdanın elle tutulan ucu asla tüpteki besiyerine temas etmemelidir. İkinci olarak kürdan, içinde besiyeri olan tüple birlikte sterilize edilmemelidir. Bunun nedeni tahta kürdanın besiyerini emmesi ve kürdanın muhtemelen emprenye[4] edilmesi sırasında kullanılan kimyasalların besiyeri ile olumsuz bir etkileşime girme endişesidir. Eğer kürdan ve besiyeri beraberce sterilize edilecekse kürdanın besiyerine temas etmemesi sağlanmalıdır.

Test edilen kültürde beklenmedik sonuçlar alınıyorsa öncelikle kültürün saf olup olmadığı kontrol edilmelidir. Örneğin, *Salmonella* kuşkusu ile selektif bir besiyerinden izole edilen tipik bir koloniye izolasyon aşamasında ya da daha sonra *E. coli* bulaşırsa uygulanan testler sırasında hem *Salmonella* hem de *E. coli* için pozitif sonuçlar alınacak ve sağlıklı bir tanımlama yapılamayacaktır.

Bu gibi şüpheli durumlarda kültür, paralel olarak hem hedef mikroorganizma için selektif besiyerine hem de CASO agar gibi genel bir besiyerine öze ile tek koloni oluşturacak şekilde sürülür ve inkübasyona bırakılır. Genel besiyerinde morfolojik olarak belirgin farklı koloniler varsa kontaminasyon olduğu açıktır.

---

[3] Bazı bilimsel yayınlarda izolat ile suş deyimleri yanlış kullanılır. Örneğin, çiğ sütlerde *E. coli* varlığına ilişkin bir tarama çalışmasında elde edilenlerin hepsi izolattır ve bunlara izolat numarası verilir. Ancak bir çalışmada şahit olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922, suştur. Tanımlanması tam olarak yapılmış ve ulusal/ uluslararası kültür koleksiyonlarında yer almıştır.

[4] Emprenye, ahşabın bünyesine farklı yöntemlerle çeşitli kimyasal maddeleri emdirme işlemidir.

Kolonilerin hepsi aynı morfolojide ise bu kontaminasyon olmadığının göstergesi değildir. Farklı türler hatta farklı cinsler, aynı morfolojide koloni oluşturabilirler. Örneğin, *Citrobacter freundii* kültürüne *Enterobacter aerogenes* bulaşırsa VRB agarda dahi bu iki bakteri aynı koloni morfolojisi gösterir. Bulaşmış olduğundan endişe edilen kültür, uygun bir selektif besiyerine sürülüp oluşan tipik koloni yeniden izole edilir (reizolasyon) ve temel tanımlama testleri uygulanır.

06.03.02. İzolasyonda 1:100 Oranı

Sağlıklı bir izolasyon için standart 90 ya da 100 mm çaplı Petri kutusunda en çok 100 adet koloni olması kabul edilir. Bu sayıda standart 0,5-2 mm çaplı koloniler, Petri kutusu içinde düzgün olarak dağılmış ise farklı renkteki bir koloni diğerleri içinden kolaylıkla fark edilerek kontaminasyon olmaksızın güvenle izole edilebilir. Bu kural, özellikle 100 adet renkli koloni içinde 1 adet renksiz koloni için geçerlidir. 150 adet renkli koloni içinde 1 adet renksiz koloninin fark edilerek bunun izolasyonu önemli ölçüde deneyim gerektirir.

Bu durumda, örneğin *E. coli* O157:H7 analizinde CT-SMAC agar besiyerinde gelişebilen refakatçi floradan renkli koloni oluşturanlar, renksiz koloni oluşturan *E. coli* O157:H7'nin varlığını maskeleyebilir ve sonuç "*E. coli* O157 serotipi yoktur" şeklinde sahte negatif olarak alınabilir.

Gıda sanayisinde yapılan analizlerde özellikle katı besiyeri selektivitesindeki yetersizliğe bağlı olarak bu gibi sahte negatif sonuçlar sıklıkla alınmaktadır.

Refakatçi flora baskılanmasına yönelik olarak yapılacak uygulamaların büyük çoğunluğunun hedef mikroorganizmayı da etkileyeceği açıktır. Halofil, ozmofil, termofil vb. grupların analizinde sadece hedef mikroorganizmanın bu özelliği ile refakatçi flora baskılanmaktadır. Örneğin, ozmofil maya analizinde %50 glikoz derişimi, refakatçi florada bulunan bakterilerin gelişimini tümüyle baskılar.

Bu örnek sadece çok ender birkaç mikroorganizma analizi için geçerlidir. Oysa gıda mikrobiyolojisindeki analizlerin pek çoğunda, hedef mikroorganizma analizi sırasında refakatçi flora baskılaması önemli ölçüde görülür. Bu durum özellikle yakın akraba türler arasında görülür.

Selektif zenginleştirme aşamasında ya da selektif katı besiyerinde refakatçi floranın baskılanması, besiyeri geliştirme çalışmalarının temellerinden birisidir.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde sahte negatif sonuçlardan olabildiğince kaçınmak için özellikle yoğun refakatçi flora varlığı olan gıdalardaki patojen analizlerinin immunokromatografi esaslı kitler (örneğin, Singlepath) ile yapılması ayrı bir önem taşımaktadır.

06.03.03. Selektif İzolasyon

Çevre ve klinik kaynaklı olanlar da dâhil olmak üzere herhangi bir numunede sadece tek bir tür (örneğin *E. coli*) aranabileceği gibi bombaj yapmış bir

salçada *Lactobacillus* spp. de aranabilir. Bu amaçla selektif sıvı ve/veya selektif katı besiyerleri kullanılır. Bazı analizlerde hedef mikroorganizmaya yönelik zenginleştirme uygulanırken bazı analizlerde numune doğrudan selektif katı besiyerine sürülür.

Selektif izolasyonda asıl olarak selektif besiyerleri kullanılır. Basit bir örnekle bir gıda numunesinde koliform bakteri analizi yapılacaksa VRB agar kullanılır. 37 °C'ta 24 saat inkübasyon sonunda bu besiyerinde gelişen 1-2 mm çapında kırmızımsı bir çökelti (presipitat) zonu ile çevrili koyu kırmızı koloniler, koliform grup bakterilere aittir. Mikroskobik morfoloji ya da koloni morfolojisine göre bu kolooninin hangi koliform grup üyesine ait olduğu anlaşılamaz. Bunlardan sadece *Klebsiella pneumoniae* kolonisi basit bir test ile diğer koliform grup bakterilerden ayrılır. Koloniye öze ile dokunup yukarı çekildiğinde bir sünme görülürse bu *Kleb. pneumoniae* kolonisidir.

Standart VRB (VRBL) agar yerine MUG içeren florojenik VRB agar kullanılır ise inkübasyon sonunda uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışıma veren koloniler, *E. coli* Biyotip 1 (standart *E. coli*) olarak sayılır ya da bu şekilde izole edilebilir.

Standart VRB Agar besiyeri, ekimden sonra 37 °C yerine 44,5±0,2 °C'ta 24 saat inkübe edilirse besiyerinde gelişen koloniler fekal koliform grup bakterileri gösterir, ancak *E. coli* olduğu kesin değildir. Devamında standart VRB Agar yerine MUG içeren florojenik VRB agar besiyerine ekim ve 44,5±0,2 °C'ta 24 saat inkübasyondan sonra gelişen tipik kolonilerden uzun dalga boylu UV lamba altında floresan ışıma verenler *E. coli* kolonileri, floresan ışıma vermeyenler *E. coli* dışındaki[5] fekal koliform bakteri kolonileridir.

Koliform grup bakteriler, fakültatif anaerop karakterlidir. Buna göre koliform grup için kullanılan selektif besiyerinde tipik koloni oluşturmasa da gelişebilen refakatçi aerop floranın baskılanması gerekirse inkübasyon anaerop koşullarda yapılarak aerop bakterilerin koloni oluşturması engellenebilir.

Selektif ya da diferansiyel besiyeri ve/veya yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı ve/veya anaerop inkübasyon, konunun tek örnekleri değildir. Daha öncesinde psikrotrof karakterli *Listeria monocytogenes* analizinde soğuk zenginleştirme yapıldığı gözden uzak tutulmamalıdır.

Selektif izolasyonda asıl amaç refakatçi floranın koloni oluşturmasının olabildiğince engellenmesidir. Yukarıda verilen örneklerde selektif/ diferansiyel besiyeri kullanımı ile yükseltilmiş/ düşürülmüş inkübasyon sıcaklığı ve anaerop inkübasyon verilmiştir. Bu konu üzerinde verilebilecek pek çok örnek daha bulunmaktadır.

---

[5] *E. coli* O157:H7 serotipi MUG negatiftir yani florojenik besiyerlerinde floresan ışıma vermez. Ancak VRB agarda 44,5 °C'ta tipik koliform grup kolonisi oluşturur. Kimi uluslararası kaynaklarda *E. coli* O157:H7 serotipinin 44 °C üzerinde gelişemeyeceği belirtilmektedir. Ancak Ankara Üniv. Gıda Mühendisliği Bölümünde yapılan araştırmalarda bu serotipin 44,5 °C'ta kolaylıkla geliştiği belirlenmiştir.

-Örneğin hedef mikroorganizma ışınlamaya refakatçi floraya kıyasla daha dirençli ise bu durumda düşük dozda ışınlama ile selektif izolasyonda bir adım öne geçilebilir.

-Örneğin koliform grup bakteriler ve *Vibrio parahaemolyticus* çok hızlı olarak çoğalır ve buna bağlı olarak refakatçi floradan çok daha hızlı bir şekilde koloni oluşturur. Bir diğer deyiş ile selektif izolasyonda zaman faktörü de önemlidir.

06.03.04. Selektif Olmayan İzolasyon

Bombaj yapmış bir sebze konservesinde bozulma etmeni hakkında hiçbir tahminde bulunulamıyorsa genel besiyeri kullanılır. Plate count agar, tryptic soy (CASO) agar gibi genel bir besiyerinden ardışık 2 seyrelti x 3 farklı inkübasyon sıcaklığı x 2 inkübasyon atmosferi olmak üzere 12 adet Petri kutusu hazırlanır. Dolgu sıvısının 10^{-1} seyreltisi hazırlanır. Orijinal dolgu sıvısı (10^{0}) ve 10^{-1} seyreltiden (ya da yoğun bakteri gelişmesi varsa 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltiden) altışar Petri kutusuna 0,1'er mL yayma yapılır ve Petri kutuları aerop ve anaerop koşullarda 28, 37 ve 55 ºC'ta inkübasyona bırakılır. Bozulmuş gıda numunesinin özelliğine göre psikrofil/ psikrotrofların belirlenmesi amacıyla gerekirse inkübasyon 6,5 ºC'ta da yapılabilir. Anaerop bakteri sayımı/ aranması için anaeroplara özgü besiyerlerinin kullanılması da mümkündür, hatta çoğu standartta bu besiyerlerinin kullanılması önerilir.

Aynı bozulmuş gıda maddesinden farkı inkübasyon sıcaklıkları ve/veya farklı inkübasyon atmosferinde (aerop/ anaerop) yapılacak inkübasyondan sonra farklı Petri kutularından aynı bakterilerin izole edilebileceği gözden uzak tutulmamalıdır. Örneğin *E. coli*, genel bir katı besiyerinde 28 ºC ve 37 ºC'ta yapılacak aerop ve anaerop inkübasyonda aynı morfolojide koloni oluşturur.

06.03.05. Tanımlama (İdentifikasyon)

Gıda mikrobiyolojisinde izole edilen bir bakterinin tanımlanması çoğu kez önemlidir. Örneğin, bir gıda maddesinden izole edilen bakterinin gerçekten *Salmonella* olup olmadığının belirlenmesi önemlidir. Buna göre, ürün imha edilebilir ya da güvenli bir şekilde pazarlanabilir.

Ne olduğu hiç bilinmeyen bir izolatın tanımlanması ile belirli bir cins ya da tür olup olmadığının belirlenmesindeki yöntemler ve yaklaşımlar oldukça farklıdır. Örneğin, izolatın *Salmonella* olup olmadığının incelenmesindeki uygulamalar ile izolatın ne olduğunun araştırılması çok farklıdır. İzolatın *Salmonella* olup olmadığının araştırılmasında doğrudan bu bakteriye yönelik triple sugar iron agar besiyerindeki reaksiyonlar, urease testi, lysin iron agar testi uygulanması ile sonuç alınabilir. Bu analizlerin sonucunda izolatın *Salmonella* olmadığı kesin olarak anlaşılırsa ne olduğu çoğu defa önemsenmez.

Ne olduğu bilinmeyen, örneğin genel bir besiyerinden izole edilmiş Gram negatif çubuk bakterinin ne olduğunun tanımlanabilmesi için öncelikle hangi

ana gruba girdiğinin belirlenmesi gerekir. Basitçe VRBD agara sürme yapıp 37 ºC'ta 24 saat inkübasyon sonunda görülen koyu kırmızı renkli 1-2 mm çapındaki koloniler, izolatın *Enterobacteriaceae* üyesi olduğunu gösterir. Bu şekilde ana grup belirlenmiştir. Bu izolat Kligler iron agara ekilip 37 ºC'ta 24 saat inkübasyon sonunda glikozdan asit ve gaz oluşturma, H_2S oluşturma ve laktozu kullanma test sonuçları alınmış olur. İzolatın laktoz pozitif ve glikozdan gaz oluşturma test sonucu pozitif ise koliform grup olma olasılığı yüksektir.

Bu durumda sonraki aşama izolatın, içinde Durham tüpü bulunan LST broth ya da brilliant green %2 bile broth besiyerine aşılanıp 37 ºC'ta 24 saat inkübasyona bırakılmasıdır. Bu süre sonunda besiyerinde gelişme ve tüpte gaz oluşumu, koliform grubu gösterir ve bu şekilde devam edilir.

Bu uygulamada en az sayıda besiyeri kullanılır, ancak süre uzundur. Bunun yerine izolata bir defada laktoz, H_2S, glikozdan gaz, indol, metil red, Voges-Proskauer (VP), lisin dekarboksilaz ve hareket testi uygulanırsa daha çok sayıda besiyeri kullanılır, ancak tanımlamada önemli ölçüde yol alınmış olur. Bu testlerde elde edilen sonuçlar, Bergey's Manual gibi uluslararası geçerliği olan kaynaklardaki sonuçlar ile kıyaslanarak tanımlama tamamlanır.

Sonucu pozitif ya da negatif olarak alınan testlerdeki değerlendirmeler, test edilen bakteri türünün daha önce denenen yüzlerce suşu içinde yüzde kaçının bu reaksiyonu pozitif olarak verdiği ile ilişkilidir. Laboratuvarda yapılan fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları pozitif ya da negatif olarak alınır. Eğer zayıf ya da şüpheli sonuç alındı ise test tekrarlanmalıdır. Buna karşın Bergey's Manual gibi kaynaklarda test sonucu +; [+]; V; [–] ve – şeklinde gösterilir. Bu simgeler şöyle okunmalıdır:

\+ = %90-100 pozitif (%0-10 negatif),
[+] = %76-89 pozitif (%11-24 negatif),
V = %25-75 pozitif (ya da negatif),
[–] = %11-24 pozitif (%76-89 negatif),
– = %0-10 pozitif (%90-100 negatif).

Bir diğer ifade ile bu gibi kaynaklarda örneğin + işareti, daha önce tanımlanması tam olarak yapılmış suşlarda bu test sonucunun %90-100 oranında pozitif sonuç olarak alındığını, ancak %0-10 negatif sonuç da olabileceğini gösterir. Buna göre bu gibi kaynaklarda [+] ve [–] şeklinde gösterilen analiz sonuçları, %90-100 düzeyinde pozitif ya da negatif sonuç olarak kabul edilirken V (variable; değişken) ile gösterilen analiz sonuçları hiçbir koşulda kullanılmaz.

Bazı tanımlama kaynaklarında w ile gösterilen test sonucu, "weak; zayıf reaksiyon" olarak değerlendirilmelidir.

Farmer ve ark. (1987) "*Enterobacteriaceae*. Clinical and Pathogenic Microbiology" gibi kaynaklarda ise simgeler yerine doğrudan sayısal değer

verilir. Örneğin, adı geçen kaynakta *E. coli* için indol test sonucu %99 olarak verilmiştir. Bunun anlamı, daha önce tanımlanması tam olarak yapılmış *E. coli* suşlarının indol testi sonucunun %99 oranında "+" olarak alındığı, ancak %1 negatif sonuç da alınmış olduğudur. Kuşkusuz, kaynağın 1987 yılına ait olması sadece o tarihe kadar alınmış sonuçları gösterir.

Bir başka örnek ve adı geçen kaynağa göre, *E. coli* suşlarının %100'ü VP testinde pozitif sonuç verirken *Citr. freundii* için laktoz testi sonucunda suşların %50'si pozitif ve dolayısı ile %50'si negatif sonuç vermektedir. Buna göre, VP testi pozitif olarak elde edilen bir izolatın *E. coli* olma olasılığı varken laktoz testi için sonuç ne olursa olsun *Citr. freundii* olup olmadığı konusunda tahminde bulunmak mümkün değildir. Kuşkusuz, *E. coli* tanımlanması için sadece VP testi yeterli olamaz, çünkü VP pozitif başka bakteriler de vardır. İzolatın koliform grup üyesi olduğu kesin ise sadece indol testi yeterli olabilir. Koliform grup içinde indol pozitif olan tek tür, %99 olasılıkla *E. coli* biyotip 1'dir.

İndol test sonucu negatif olarak alınırsa izolat *E. coli* değil olarak yorumlanamaz, çünkü *E. coli* Biyotip 2 indol negatiftir. Tüm *E. coli* suşları içinde indol negatif olan *E. coli* biyotip 2 oranı sadece %1 kadardır.

API, Oxoid Microbact vb. gibi ticari kitlerde sonucun % olarak verilmesi bu esasa dayanır. Örneğin, bir izolat için *E. coli* %89 gibi bir sonuç, izolatın %89 olasılıkla *E. coli* olduğunu değil tanımlanması tam olarak yapılmış *E. coli* suşlarının %89'unun bu kitte kullanılmış olan testlerde bu reaksiyonları vermiş olduğunu gösterir. Sonucu, doğru okuma ve anlama şekli böyledir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında klasik yöntemlerle yapılan tanımlamada, basit ve yaygın olarak morfolojik analizler ve biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Faj tiplendirmesi ve genetik esaslı testler, ancak gelişmiş laboratuvarlarda ve genellikle bilimsel araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Bu kitabın kapsamında sadece basit morfolojik ve biyokimyasal testler verilmiştir.

Morfolojik analizler temel olarak koloni morfolojisi ve mikroskobik morfoloji olarak iki şekilde yapılır. Belirli inkübasyon koşullarında elde edilen koloni şekli ve büyüklüğü ile basit boyanmış ve Gram boyanmış kültürlerin mikroskobik morfolojisi, bazı tanımlama testlerinde önemli ölçüde ilerleme sağlayabilir. Gereğinden uzun süreli inkübasyonda tipik koloni morfolojisi görülmeyebilir. İzolata doğrudan Gram boyama uygulanarak hem morfolojisi hem de Gram reaksiyonu belirlenebilirse de prensip olarak mikroskobik morfolojinin belirlenmesi amacıyla basit boyama testi uygulanmalıdır. Bunun nedeni Gram boyamada morfolojilerin yeterince ayrıntılı olarak görülemeyebilmesidir. Burada kastedilen, çubuk ve kok farkı değil pleomorfizm ve kokobasil gibi özel morfolojilerdir. Flagella boyama ile bakterinin hareketli olup olmadığı belirlenebilirse de hareket testinin yarı katı besiyerinde ya da çukur lamda yapılması çok daha kolaydır.

Mikroskobik morfoloji, sadece özel gruplar için geçerlidir. Örneğin, mikroskopta basit ve ardından Gram boyama sonunda Gram pozitif ve zincir şeklinde

görülen koklar; *Streptococcus*, *Lactococcus* ya da *Enterococcus* cinslerinden birini[6] gösterir. Gram negatif ya da Gram pozitif çubuk şeklinde bir bakterinin hangi familyaya girdiği kolaylıkla bilinemez. VRBD agar besiyerinden izole edilmiş tipik koloni morfolojisine sahip *Enterobacteriaceae* üyesi bir bakteriye ait kolooninin mikroskobik morfolojisinin Gram negatif çubuk bakteri olacağı beklenir. Burada gözden kaçmaması gereken husus, genel bir katı besiyerinden izole edilen Gram negatif çubuk şeklindeki bakterinin mutlaka *Enterobacteriaceae* üyesi olacağı değildir. *Enterobacteriaceae* üyeleri dışındaki bakteriler de genel katı besiyerlerinde *Enterobacteriaceae* üyelerine çok benzer koloni oluşturabilirler. Ancak bu bakteriler, VRBD agar gibi *Enterobacteriaceae* üyeleri için hazırlanmış selektif besiyerlerinde *Enterobacteriaceae* üyelerinden çok farklı koloni morfolojisinde gelişebilirler.

Yukarıda da belirtildiği gibi genel ve selektif katı besiyerinde belirgin olarak farklı morfolojideki koloniler farklı mikroorganizmalara aittir, ancak gerek genel gerek selektif katı besiyerlerinde faklı tür hatta farklı cinsteki bakteriler, aynı koloni morfolojisini verebilir. Tersine olarak saf bir bakteri kültürü, selektif/ ayırt edici farklı bileşimdeki katı besiyerlerinde, besin maddelerinin kullanımına bağlı olarak çok farklı morfolojide koloni oluşturabilir.

Basit biyokimyasal testler, genel olarak üç şekilde yapılır:

-İndol testi örneğinde olduğu gibi sonucu pozitif ve negatif olarak değerlendirilen testler. Tanımlamada en yaygın kullanılan testler bunlardır.

-Belirli bir maddenin hangi derişimine kadar gelişme olduğunun saptanması. Burada değinilen "madde", mutlaka inhibitör olmak zorunda değildir, %50 glikoz broth ortamında sadece ozmofilik/ ozmotolerant mayalar gelişebilir. Kuşkusuz, glikoz bu derişimde baskılayıcı (inhibitör) olarak etki etmektedir.

-Koloni rengi, koloni zon rengi, sıvı besiyerinde renk değişimi, floresan ışıma gibi gözle yapılan değerlendirmeler. Bunlar koloni morfolojisi gibi değil, doğrudan temel biyokimyasal testler olarak değerlendirilir.

Basit biyokimyasal testlere yönelik değerlendirmeler, spektrofotometrik okuma ve bilgisayar destekli programlar ile ya da çoğu uygulamada olduğu gibi gözle yapılır. Nümerik taksonomik yaklaşımlar da tanımlamada her zaman geçerlidir.

Basit biyokimyasal analizlerde günlük uygulanan testler için pozitif ve negatif sonuç veren iki bakterinin şahit olarak teste dâhil edilmesi, ayrıca aşılanmamış bir besiyeri tüpünün ya da Petri kutusunun da şahit olarak denemeye dâhil edilmesi gereklidir. Bunun en tipik örneği, üre testi için verilmektedir. Üre testi yapılırken 4 adet urea broth besiyeri hazırlanır. Bunlardan birincisine bakteri aşılanmaz ve inkübasyon sonunda orijinal portakal kırmızısı renk izlenir (şahit). İkincisine test edilen kültür (test), üçüncüsüne negatif sonuç için *E. coli* (ya da kültür koleksiyonunda bulunan başka bir üre negatif bakteri) ve dördüncüsüne

[6] Mikrobiyolojide aynı mikroskobik görüntüde başka streptokok grupları da vardır, ancak bunlar gıda mikrobiyolojisini genellikle ilgilendirmezler.

pozitif sonuç için *Proteus* spp. (ya da kültür koleksiyonunda bulunan başka bir üre pozitif bakteri) inoküle edilir. Bu dört tüpün beraberce inkübasyonu ve renk değerlendirilmesi sonucunda test kültürünün üre reaksiyonu belirlenir.

Bu testlerde gereken kültür koleksiyonu uygulaması, aşağıda 06.07. Kültür Koleksiyonu bölümünde verilmiştir.

06.04. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler

Klasik yöntemlerle çalışan gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında bir izolatın tanımlanmasında morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testlerden yararlanılır. Bilimdeki gelişmelere bağlı olarak günümüzde karşılaştırmalı DNA dizi analizi mikroorganizma tanımlanmasında en iyi genotipik yöntem olup en yaygın olarak kullanılanı 16S ribozomal RNA analizidir. Bu analizde genin yaklaşık 500 baz çiftlik bölümü ya da tümü PCR ile çoğaltılır ve DNA dizi analizi yapılır. Elde edilen sonuçlar onaylanmış veritabanları ile karşılaştırılarak tanımlama tamamlanır. Kuşkusuz, onaylanmış veritabanları gıda, çevre, klinik ve endüstriyel mikrobiyolojide sıklıkla karşılaşılan mikroorganizmalar için bulunmaktadır. Veritabanında nadir olarak bulunan mikroorganizmalar yoktur.

Bunun dışında genetik ve immünolojik esaslı pek çok gelişmiş ve hızlı analiz sistemi izolatın tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bakteriyofaj kullanılarak yapılan faj tiplendirmesi çeşitli laboratuvarlarda uygulanmaktadır. Benzer şekilde antijen-antikor ilişkilerine dayanan serolojik testler *Salmonella* ve diğer bazı bakterilerin tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Bu bölümde gıdalardan elde edilen izolatların tanımlanmasında kullanılan temel morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler hakkında kısaca bilgi verilmiş, yöntemler açıklanmıştır.

Her şeyden önce, tanımlama testine alınacak mikroorganizmanın saf olduğundan emin olunmalı ve bu testlerde aktifleştirilmiş kültür kullanılmalıdır. Yaşlı kültürlerle yapılan testler doğru sonuç vermeyebilir.

06.04.01. Morfolojik Testler

Asıl olarak koloni morfolojisi ve mikroskobik morfoloji kastedilmektedir.

Mikroorganizmalar, bileşim açısından kayda değer farkları olan katı besiyerlerinde gelişirlerken farklı morfolojik özellikte koloni oluştururlar. Bunun en tipik örneği olarak *E. coli* verilebilir. *E. coli* ile diğer tüm koliform grup bakteriler, CASO ya da plate count agar ile standart VRB ya da VRBD agar besiyerinde aynı morfolojide koloni oluştururken *E. coli* kolonisi florojenik besiyerlerinde uzun dalga boylu UV ışığı altında floresan ışıma ve CCA besiyerinde mavi renkli koloni oluşturarak diğer koliform grup bakterilerden ayrılır. Benzer örneklere bu kitabın içeriğinde sıklıkla rastlanılabilir. Aynı

besiyerinde farklı cins hatta farklı familyadaki mikroorganizmalar, benzer koloni morfolojisi oluşturabilirler.

Düz, bombeli, yayılıcı, dantelli, çökük vb. bakteri koloni morfolojisi görüntülerine pek çok kaynaktan kolaylıkla erişilebilir.

Koloni morfolojisi özellikle küf tanımlamalarında önemlidir. Küf izolatının belirli selektif katı besiyerlerinde oluşturduğu kolooninin Petri kutusunun üzerinden ve tabanından görüntüsünün incelenmesi ile bir düzeye kadar tanımlama yapılabilmektedir. Bazı küflerde koloni morfolojisi çok tipiktir. Bu görüntülere www.mikrobiyoloji.org adresi Galeri bölümünden ve diğer pek çok kaynaktan erişilebilir.

Mikroskobik morfolojinin incelenmesinde kullanılan mikroskoplar, basitçe 3 grupta incelenebilir: Işık mikroskopları, stereo (üç boyutlu) mikroskoplar ve elektron mikroskopları.

Mikroskop 1683 yılında icat edilmiştir ve bu icat mikrobiyolojinin başlangıcı olarak kabul edilir. Işık mikroskopları, hücrenin morfolojik (çubuk, kok, spiral ya da vibrio) görüntüsünün incelenmesi yanında sayım ve mikroskopta hareket testi vb. amaçlarla da kullanılırlar. Stereo mikroskoplar, görüntünün üç boyutlu olarak incelenmesini sağlar ve özellikle küf kolonisinin tanımlanmasında kullanılırlar. Elektron mikroskop 1930'lu yıllarda icat edilmiştir. Gıda mikrobiyolojisinde genellikle fajların incelenmesi vb. amaçlarla kullanılırlar.

Mikroskobik tanımlamalar özellikle klinik mikrobiyolojide oldukça önemli iken gıda sanayisinde günlük analiz yapan laboratuvarlarda aynı öneme sahip değildir. Bunun başlıca nedeni klinik mikrobiyolojide materyalin genellikle kanlı agar gibi zengin bir besiyerine sürülmesi ve izolatın bu şekilde genel bir besiyerinden elde edilmesi, buna karşın gıda mikrobiyolojisinde izolatın genellikle selektif bir besiyerinden elde edilmesidir. Örneğin, VRB agar besiyerinden elde edilen tipik koloni zaten Gram negatif çubuk şeklinde bir bakteri olacaktır. Plate count agar gibi genel bir besiyerinde gelişen bakterinin tanımlanması ise önce hücrelerin basit boyama ile mikroskobik morfolojisinin belirlenmesi ile başlar. Gıda mikrobiyolojisi araştırma laboratuvarlarında mikroskobik morfoloji tanımlamasının önemli bir yeri vardır.

Göreceli olarak daha büyük olan maya ve küf hücrelerinin mikroskopta incelenmesinde boyamaya gerek duyulmayabilir. Ancak bakterilerde mikroskobik morfolojik inceleme amacıyla boyama uygulanır. Boyama yapmadan basit preparat ile de mikroskobik morfoloji belirlenebilirse de mikroskop kullanmada deneyim isteyen bir uygulamadır. Mikroskopta hareket testinde boyama yapılmadan basit preparat uygulanır. Gıda mikrobiyolojisinde en çok kullanılan tanımlama esaslı mikroskobik testler basit boyama, Gram boyama ve hareket testleridir.

Küflerin incelenmesinde, tam saydam bir selofan bant iki parmağa tutturup yapışkan kısmı küf kolonisine değdirilir ve bu bant, lama yapıştırılarak

mikroskopta incelenir. Bu şekilde yapılan basit preparat incelemesi küf morfolojisi hakkında yeterli olabilmektedir.

06.04.01.01. Basit Boyama

İşlem, lam üzerine kültürden birkaç öze aktarılması ve ardından sırası ile yayma, kurutma, fiksasyon, boyama, yıkama, kurutma ve mikroskopta inceleme aşamalarından oluşur. Temel olarak morfolojik inceleme için yapılır. Her ne kadar doğrudan Gram boyama ile hem Gram reaksiyon hem de morfoloji belirlenebilirse de morfolojik inceleme için basit boyama önerilmektedir.

Mikroskopta incelenecek materyal agarlı besiyeri üzerinde ise koloninin bir kısmı 1 mL kadar su içeren küçük bir deney tüpüne aktarılır ve tercihen tüp karıştırıcıda kuvvetlice karıştırılıp homojen süspansiyon haline getirilir. Bu işlem sırasında besiyeri parçacıklarının da alınmamasına dikkat edilmelidir. Lam üzerine Pastör pipeti ile birkaç damla su aktarılıp koloni bu suyun içinde süspansiyon haline getirilebilirse de çok yoğun bir aktarım olacağı için sağlıklı bir görüntü elde edilemeyebilir. Sıvı besiyerindeki kültür doğrudan kullanılır. Bu kültürden temiz bir lam üzerine birkaç öze dolusu materyal lam üzerine aktarılır ve lamın üzerine ince bir film tabakası halinde yayılır.

Kendi halinde (havada) iyice kurumasının ardından lam üzerine fiksasyon (lam üzerine yapıştırma, tespit etme) işlemi yapılır. Fiksasyon, hücrelerin suyunu alarak lama yapıştırma ve boyama sırasında lam üzerinde yapışık kalmalarını sağlama işlemidir. Termal ve kimyasal[7] olarak iki şekilde yapılır. Basit ve Gram boyama işlemlerinde termal fiksasyon uygulanır.

Termal fiksasyon amacıyla lamın alt yüzü birkaç kez Bunsen beki alevinden geçirilir. Hazırlanan preparat üzerine Pastör pipeti ile ve genellikle Löffler's (Loeffler's) methylene blue çözeltisi preparat inceleme alanını kaplayacak şekilde damlatılır, 60 sn beklenir ve damıtık su ile yavaşça yıkanır. Lam kendi halinde kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra preparat inceleme alanı üzerine bir damla sedir (immersiyon) yağı damlatılarak 100x büyütme güçlü (immersiyon) objektifte incelenir.

Göreceli olarak bakterilerden daha büyük olan maya hücrelerinin incelenmesi 60x ya da 40x büyütme güçlü objektiflerle yapılabilir.

06.04.01.02. Gram Boyama

Christian Gram tarafından 1884 yılında geliştirilmiş diferansiyel (birden fazla boyanın kullanıldığı) bir boyama tekniğidir. Sadece bakteriler için uygulanır. Maya ve küf hücrelerinin Gram pozitif ya da Gram negatif şeklinde sınıflandırılması söz konusu değildir. Bakteriler hücre çeperlerindeki lipit ve lipit

[7] Kimyasal fiksasyon için tipik uygulama örneği, çiğ sütte Breed yöntemi ile toplam bakteri sayımı olarak verilebilir.

türevlerine göre boyama sonunda mavi-mor (Gram pozitif) ya da kırmızı-pembe boyanırlar (Gram negatif). Bazı Gram pozitif bakteriler, boyama sırasında kullanılan renksizleştirici (dekolorizatör) çözeltisine duyarlı oldukları için bunlar da kırmızı-pembe renkte görülebilir. Bunlar Gram labil (duyarlı) olarak adlandırılır. Bazı bakterilerin çok yaşlı kültürleri farklı reaksiyon verir. Bunlar da Gram variable (değişken) olarak adlandırılır. Genellikle Gram pozitif bakteri kültürü yaşlanınca Gram negatif reaksiyon verir. Gram variable etkiden sakınmak için bakterilerin 18-24 saatlik kültürleri kullanılır.

Preparat, yukarıda basit boyama kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanır. Fiksasyondan sonra crystal violet çözeltisi damlatılıp 1 dk beklenip boyanın fazlası uzaklaştırılır. Sonra Lugol iyot çözeltisi ile yıkanır, tekrar aynı iyot çözeltisi damlatılıp 1 dk beklenir. Preparat saf su ile yıkandıktan sonra lam üzerine renksizleştirici çözelti (dekolorizatör) ilave edilip 25-30 sn süre ile beklenir ve saf su ile yıkanır. Son olarak safranin çözeltisi ile kaplanır, 30 sn beklenir, saf su ile yıkanır. Lam kendi halinde kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra yayma alanı üzerine 1 damla sedir (immersiyon) yağı damlatılarak 100x büyütme güçlü (immersiyon) objektifte incelenir.

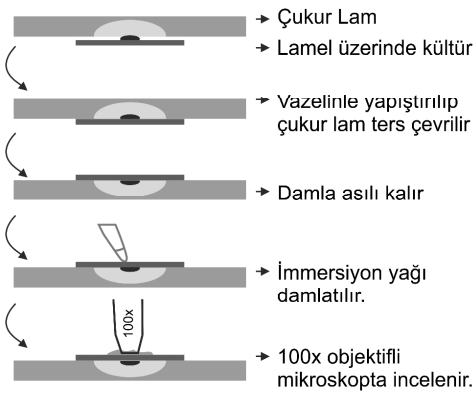
Gram boyamada özellikle renksizleştirici olarak kullanılan çözeltinin bileşimi, boyaların derişimi gibi faktörlere göre değişmek üzere farklı uygulama süreleri olduğu göz önünde tutulmalıdır. Gram boyama için hazır ticari boyama kitleri vardır. Ticari kit kullanılacaksa üretici firma talimatlarına uyulmalıdır.

Bakterilerin Gram reaksiyonları, boyama yapılmadan da basitçe belirlenebilir. İlk kez 1938 yılında E. Ryu adlı Tayvanlı araştırıcı tarafından açıklanan bir yöntemle lam üzerinde Pastör pipeti ile %3'lük KOH çözeltisinden bir damla damlatılır ve koloni, bir öze yardımı ile sürekli karıştırılarak süspansiyon haline getirilir. Gram pozitif bakterilerde herhangi bir reaksiyon görülmez. Gram negatif bakterilerde ise hücre duvarı %3 KOH ile erir ve arkasından bakteri DNA'sı KOH ile viskoz bir yapı alır. Bu viskoziteye bağlı olarak özenin bu karışımdan hafifçe yukarı çekilmesi ile bariz bir sünme görülür. Bu sonuç, KOH Sündürme Testi (KOH String Test) pozitif olarak değerlendirilir ve Gram negatif bakteriler için tipiktir. Bu test, henüz ISO ve FDA gibi uluslararası kuruluşlarca onaylanmış değildir.

06.04.01.03. Hareket Testi (Asılı Damla)

Bakterilerin hareketli olup olmadıklarının belirlenmesi üç şekilde saptanabilir. Bunlar, yarı katı besiyerinde hareket testi, mikroskopta asılı damla ile hareket testi ve flagella boyama testidir.

Asılı damlanın uygulanışı Şekil 06.02'de şematik olarak gösterilmiştir. Standart bir lamel üzerine birkaç öze dolusu bakteri kültürü, damla olacak şekilde aktarılır. Çukur lamın çukur kısmının kenarlarına vazelin sürülür ve lamın çukur kısmı damla üzerine gelecek şekilde yerleştirilir. Vazelin, lam ile lamelin yapışmasını sağlar. Lam, dikkatli bir şekilde ve yeterince hızlı bir şekilde ters çevrilir. Bu pozisyonda damla lamele asılı halde kalır. Damla lamelde asılı kalmalı, lama düşmemelidir.



Şekil 06.02. Asılı damla hareket testi

Kültür fazla aktarılırsa damlanın düşme olasılığı artar. Bu konuda deneyim kazanmak için önce musluk suyu ile çalışılması önerilir. Lamel üzerine 1 damla sedir yağı damlatılarak 100x büyütme güçlü objektifte mikroskop diyaframı kısık bir şekilde incelenir. Aşırı aydınlık bir mikroskopta hem bakteriler görülemez hem de bakteriler ışık kaynağından gelen sıcağın etkisi ile giderek hareketsizleşir.

Flagella boyama yöntemi günlük uygulamada kullanılmaz. Basit olarak bu testte bakterilerde flagella boyanır ve mikroskobik incelemede flagella görülürse hareket testinin pozitif olduğuna karar verilir.

06.04.02. Fizyolojik Testler

06.04.02.01. Gelişme Testleri

Belirlenmiş bir besiyerinde ve belirlenmiş bir inkübasyon koşulu (sıcaklık/ süre/ inkübasyon atmosferi) sonunda izolatın gelişip gelişememesi, fizyolojik testler olarak değerlendirilir. Yarı katı agar besiyerinde hareket testi de fizyolojik bir testtir. Besiyeri CASO (tryptic soy) broth gibi genel bir besiyeri olabileceği gibi, laktik asit bakterilerinin tanımlanma testlerinde olduğu gibi örneğin %0,1 metilen mavisi içeren yağsız süt (skim milk) de olabilir. Aşağıda fizyolojik testlere örnekler verilmiştir.

-*Pseudomonas aeruginosa* 42 ^{o}C'ta 24 saatte gelişebilir, ancak *Pse. fluorescens* gelişemez. Bu analiz CASO broth gibi genel bir besiyerinde yapılabilir.

-Mikroskopta, streptokok şeklinde görülen bakteriler, aşağıdaki fizyolojik testlerle (+: gelişme; –: gelişememe) kolaylıkla ana gruplara ayrılabilir:

Streptokoklar	%0,1 Metilen Mavisi	%6,5 NaCl	45 °C
Piyogen	–	–	–
Viridans	–	–	+
Enterokok	+	+	+
Laktokok	+	–	–

06.04.02.02. Hareket Testi (Besiyerinde)

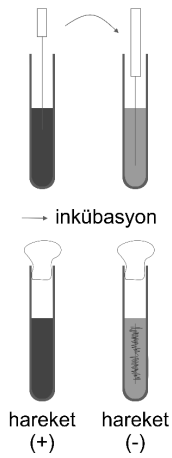
Besiyerinde hareket testi, prensip olarak yarı katı besiyerinde yapılır. Besiyeri pH'sı ve agarın jelleşme yeteneğine göre değişmek üzere %0,2-0,4 agar ilavesi ile hazırlanan besiyerleri "yarı katı" olarak tanımlanır. Sıvı besiyerinde bakteri ister hareketli ister hareketsiz olsun tüm besiyerinde bulanıklık yapar. Tersine olarak, standart katı besiyerinde koloni hareketin engellenmesi ile oluşur. Başta *Bacillus* türleri olmak üzere bazı bakteriler aşırı hareket ile tüm yüzeyi kaplayacak şekilde koloni oluştururlar ise de yayılma göstermeyen bakteri kolonilerinin hareketsiz olduğu söylenemez.

Oysa yarı katı besiyerinde tüpün aşı iğnesi kullanılarak bir defada besiyerinin tam ortasından dik olarak inoküle edilmesi ve inkübasyon sonunda tüpteki gelişmenin incelenmesi ile bakterinin hareketli olup olmadığı test edilebilir. Basit olarak inkübasyon sonunda gelişme tüm besiyerinde olursa hareket pozitif, sadece aşılama hattı boyunca olursa hareket negatif olarak değerlendirilir.

Hareket testinde pozitif ve negatif şahit kullanımı, diğer testlerdeki pozitif ve negatif şahit kullanmaya göre daha önemlidir. Pozitif şahit olarak *E. coli*, negatif şahit olarak *Kleb. pneumoniae* kullanılabilir.

Test, basit olarak CASO broth ya da nutrient broth gibi genel sıvı besiyerlerine %0,2-0,4 oranında agar ilave edilerek hazırlanan yarı katı besiyerinde yapılabileceği gibi SIM medium gibi doğrudan bu amaca yönelik olarak geliştirilmiş besiyerlerinde de yapılabilir. İlave edilecek agar derişimi, doğrudan agarın jelleştirme gücü ile ilgilidir. Yarı katı besiyerinde hareket testinin uygulanışı Şekil 06.03'de şematik olarak gösterilmiştir.

Yarı katı besiyerinde yapılan hareket testinde, *Bacillus* spp. gibi aeroplar tüpün yüzeyinde, *Clostridium* spp. gibi anaeroplar tüpün dibinde ve *Enterobacteriaceae* üyeleri gibi fakültatif anaeroplar tüpün her yerinde gelişecekleri için hareket testinde bu özellikleri dikkate alınmalıdır. Fakültatif anaerop olan *Listeria monocytogenes*, hareket testinde tüpün üstünde açılmış bir şemsiye ya da çam ağacı benzeri tipik bir gelişme gösterir.



Şekil 06.03. Yarı katı besiyerinde hareket testi

Bu test, esas olarak flagella varlığının belirlenmesi değil hareketin gösterilmesi üzerine kurulmuştur. Flagella varlığı her zaman hareketi ortaya koymaz. Örneğin, besiyerinde hareket testi ile yapılan analizde flagellaya sahip olan *Yersinia* türleri 25 ºC'ta hareket pozitif, 37 ºC'ta hareket negatif sonuç verir. Benzer durum *Listeria* için de geçerlidir.

06.04.03. Biyokimyasal Testler

Mikroorganizmalar, sahip oldukları enzimler ile belirli bir substratı parçalayarak başka maddeler oluştururlar. Oluşan bu maddelerden özel bir tanesinin belirlenmesi bir anlamda hücrenin ilgili enzime sahip olduğunu gösterir. Katalaz gibi bazı enzimler, çok sayıda bakteri grubunda bulunurken ß-D-glucuronidase (β-GUR, MUGase) enzimi, sadece *E. coli* biyotip 1'de ve birkaç *Salmonella* ile birkaç *Shigella* suşunda bulunur. Buna göre, β-GUR enziminin MUG (4-methylumbelliferyl-ß-Glucuronide) substratını parçalaması sonunda oluşan parçalanma ürünlerinden olan methylumbelliferone, uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışıma yapar. Sonuçta MUG içeren bir selektif besiyerinde uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışıma görülürse *E. coli* varlığı anlaşılır. İlave indol testi ile bu sonuç kesinleşir. *E. coli*, β-GUR ve indol pozitif tek bakteridir. β-GUR enzimi, CCA besiyerinin bileşimindeki X-glucuronide substratını parçalayarak *E. coli* kolonisinin mavi/ mor renkte olmasını sağlar (bknz⇒ 14.08. *E. coli* analizi bölümü).

Mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler ne olduğu hakkında belirli bir ilerleme sağlanmış izolatlar için uygulanır. Bu amaçla en azından bakterinin Gram reaksiyonu ve mikroskobik morfolojisi bilinmelidir. Bir izolatın belirli bir tür (örneğin, *E. coli*) olup olmadığının belirlenmesi amacıyla uygulanacak testler ile örneğin *Enterobacteriaceae* üyesi olduğu bilinen bakteri türünün belirlenmesi için uygulanacak testler farklıdır. IMVEC ve HOMoC[8] testleri asıl olarak koliform grup bakterilerin ayrımı için kullanılır.

Aşağıda gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında bakteri tanımlanması amacıyla en çok kullanılan bazı biyokimyasal testler verilmiştir.

06.04.03.01. İndol Testi

Bazı bakteriler triptofanaz enzim aktivitelerine bağlı olarak besiyerinde bulunan triptofan aminoasidinden indol oluşturur. Dolayısı ile testin doğru adı, triptofanaz enzimine bağlı olarak "triptofandan indol oluşumu" olmakla birlikte basitçe ve yaygın olarak indol testi şeklinde kullanılır.

[8] IMVEC; **I**ndol, **M**etil Red, **V**oges-Proskauer, **E**ijkman, **C**itrat testlerini ifade eder. Öncesinde IMViC olarak bilinirdi ve i harfi okuma kolaylığı için kullanılırdı. HOMoC **H**$_2$S oluşumu, **O**rnitin dekarboksilasyonu, **Mo**tility (hareket), **C**itrat testlerini ifade eder. Burada ikinci o harfi küçük yazılır, okuma kolaylığı sağlar.

Daha önce yapılmış araştırmalara göre, *E. coli* suşlarının %99'u triptofanaz enzimi varlığına bağlı olarak indol testinde pozitif sonuç verirken *Citr. freundii* suşlarının sadece %5'i bu testte pozitif sonuç vermektedir. Buna göre izolata uygulanan indol testi sonucunda elde edilen pozitif sonuç çok düşük bir olasılıkla *Citr. freundii* ve negatif sonuç da çok düşük bir olasılıkla *E. coli* için gerçekleşebilir. Nadir görülen *E. coli* biyotip 2, indol negatiftir.

Triptofan aminoasidi, belirli bakteriler tarafından okside edilerek indol, indol asetik asit ve skatol (metil indol) olmak üzere indolik metabolitlere dönüşür. Triptofanın intraselüler bir enzim olan triptofanaz ile parçalanmasında temel ara ürün, indol pirüvik asittir. Bunun deaminasyonu ile indol ve dekarboksilasyonu ile skatol meydana gelir.

Triptofanaz enzimi varlığına bağlı olarak oluşan indol, basit olarak besiyerine Kovacs' indol ayıracı damlatılarak belirlenir. Kovacs' indol ayıracının bileşimi 5 g para-dimethylaminobenzaldehyde; 75 mL n-amil alkol ve 25 mL derişik (~%37) HCl şeklindedir. Bu ayıraç, ticari olarak hazırlanmış preparat olarak sağlanabileceği gibi, laboratuvarda formülden de hazırlanabilir. Bu amaçla 5 g para-dimethylaminobenzaldehyde, 75 mL n-amil alkolde eritilip üzerine yavaşça 25 mL derişik HCl ilave edilir.

İndol testi, genel olarak sıvı besiyerinde yapılır. Bu amaçla en yaygın olarak ve uluslararası standartlara göre tryptone water besiyeri kullanılır. SIM (sulphur, indole, motility medium) gibi yarı katı besiyerlerinde indol testi yapılması mümkün ise de günlük analizlerde fazlaca değer bulmamıştır. Oysa bu besiyeri tanımlamaya yönelik bilimsel araştırmalarda yoğun şekilde kullanılmaktadır. Buna karşın, *E. coli* analizinde kullanılan Fluorocult LST broth[9] ve ReadyCult Coliforms gibi besiyerlerinin bileşimindeki triptofan varlığı sayesinde bu besiyerlerinde doğrudan indol testi yapılabilir ve günlük analizlerde bu besiyerleri yaygın şekilde kullanılmaktadır.

İndol testi uygulanacak olan ~18 saatlik aktif ve saf kültür, yaklaşık 5 mL tryptone water besiyerine öze ile inoküle edilir, uygun sıcaklıkta 24 saat inkübasyon sonunda kültür üzerine 0,5 mL kadar (Pastör pipeti ile birkaç damla) Kovacs' indol çözeltisi ilave edilip tüp elle karıştırılır. En geç 1 dk içinde tüpün üzerinde vişneçürüğü renkli bir halka görülmesi halinde indol testi pozitif olarak değerlendirilir. Sarı renkli halka oluşursa test sonucu negatiftir. Turuncu renkli halka skatol oluşumunu gösterir ve indol negatif sonuç olarak değerlendirilir. Bu test ReadyCult Coliforms besiyerinde yapıldığında besiyeri miktarına bağlı olarak kullanılacak Kovacs' indol çözeltisi miktarı orantılı olarak artar. Pozitif test sonucu genellikle 15-20 sn içinde alınır.

İndol testi için pozitif şahit olarak *E. coli*, negatif şahit olarak *Ent. aerogenes* kullanılabilir.

[9] Standart LST Broth besiyerinde triptofan yoktur. Bu besiyerinde indol testi, her bakteri için negatif sonuç verir. Dolayısı ile indol testi yapılamaz.

-Not 1: İndol testi uygulanan kültürden reizolasyon yapılamaz. Kovacs' indol çözeltisinin içinde bulunan kimyasallar tüp içindeki kültüre önemli ölçüde zarar verir. Kuşkulu bir durum varsa indol testi öncesinde kültürden steril boş bir tüpe en az 0,5 mL kadar aktarılması önerilir.

-Not 2: İndol testi uygulanmış tüplere otoklavda sterilizasyon uygulanmaz. Aksi halde Kovacs' indol çözeltisi bileşimindeki kimyasal maddelerin buharı gerek insan sağlığına gerek otoklava zarar verir. İndol testi uygulanmış tüplerin bir gece kendi halinde bekletilmesi ile bir anlamda kimyasal sterilizasyon sağlanır. *Enterobacteriaceae* üyeleri ile yapılan testte sterilizasyon amacıyla tüpleri çeker ocak altında kaynar su banyosunda 30 dk tutmak yeterli olur.

-Not 3: Fluorocult LST Broth kültüründe aşırı asit gelişimine bağlı olarak floresan testi kesin olarak değerlendirilemeyebilir. Yüksek asitlik, floresan ışımayı maskeler. 10 mL besiyerine 1 N NaOH çözeltisinden 1 mL ilave edilir, tüp iyice karıştırılır ve floresan testi yeniden yapılır. NaOH ilave edilmiş bu tüplerde indol testi uygulanmasının indol testi açısından bir yararı ya da zararı yoktur. Bir diğer deyiş ile NaOH ilavesi, indol testini etkilemez.

-Not 4: CCA besiyeri bileşiminde triptofan vardır ve dolayısıyla indol testi, koloni üzerinde yapılabilir. Bu besiyerinde gelişmiş mavi/ mor renkli kolonilerin *E. coli* olduğu açıktır ve bunlara indol testi yapılması gerekli değildir. Kırmızı/ pembe kolonilerden indol pozitif sonuç veren olursa *E. coli* O157:H7 olma olasılığı yüksektir.

06.04.03.02. Metil Red Testi

Bazı bakteriler glikozu kullanarak fazla miktarda asit oluştururlar ve ortamın pH'sını 4,4'ün altına düşürürler. Bazı bakteriler ise daha az asit oluştururlar ve pH değerinde büyük bir düşme sağlamazlar. Bu farklılık bir pH indikatörü olan metil red kullanılarak gözlenir.

Bu test genel olarak MR-VP broth besiyerinde yapılır. 5 mL besiyerine ~18 saatlik aktif ve saf kültürden öze ile aşılama yapılır ve uygun sıcaklıkta 96 saate kadar inkübe edilir. İnkübasyonun 48. saatinde bu besiyerinden alınan 1 mL kültürde VP testi yapılır, metil red testi için tüpün inkübasyonuna devam edilir. Bununla beraber günlük uygulamada 48 saatlik inkübasyon sonunda besiyerinden alınan ~0,5 mL kültür üzerinde metil red testi yapılır, pozitif sonuç alınırsa test bitirilir, negatif sonuç alınırsa inkübasyona devam edilir.

Metil red indikatörü, laboratuvarda hazırlanır. 0,1 g metil red, 300 mL saf (%96) etil alkolde çözülür ve saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.

İnkübasyon sonunda kültür üzerine Pastör pipeti ile birkaç damla metil red indikatörü damlatılır. Rengin kırmızıya dönüşmesi bu test sonucunun pozitif olduğunu, sarı ya da turuncu renk test sonucunun negatif olduğunu gösterir. Metil red indikatörü pH 4,4 altında kırmızı ve pH 5,1 üzerinde sarı renk verir. Kültürün pH'sına bakılarak da asitlik hakkında bilgi edinmek mümkündür. Ancak bu amaçla pH metre kullanımında olası kontaminasyon ve/veya

dekontaminasyon sırasında elektrotun yıpranması nedeniyle bu uygulamadan olabildiğince kaçınılmalıdır. Uygun skalada pH kâğıdı kullanılarak da metil red testi yapılabilir. Bu şekilde pH 4,4 ve altındaki değerler, metil red test sonucu pozitif olarak değerlendirilir.

Bu testin uygulanışında dikkat edilmesi gereken en önemli husus, inkübasyonun en az 48 saat olarak yapılmasıdır. İnkübasyonun 24. saati sonunda, tüm enterik bakteriler pozitif sonuç verir. Sonrasında metil red pozitif olanlar asit oluşturmaya devam ederken negatif olanlar başlangıç fermantasyon ürünlerini dekarboksilasyon ile metabolize ederek nötral asetil-metilkarbinol (asetoin) oluştururlar. Böylece besiyerinin asitliği düşer ve pH nötral yöne doğru yükselir. Dolayısı ile testin geçerliliği en az 48 saat olan yeterli inkübasyon süresine bağlıdır.

Metil red testi için pozitif şahit olarak *E. coli*, negatif şahit olarak *Ent. aerogenes* kullanılabilir.

06.04.03.03. Voges-Proskauer (VP) Testi

Test, yaygın olarak MR-VP Broth besiyerinde yapılır. 5 mL besiyerine ~18 saatlik aktif ve saf kültürden öze ile aşılama yapılır ve uygun sıcaklıkta 96 saate kadar inkübe edilir. İnkübasyonun 48. saatinde bu besiyerinden alınan 1 mL kültürde VP testi yapılır, kalanı yukarıda açıklanan metil red testinde belirtildiği gibi kullanılır.

O'meara (potasyum hidroksit) çözeltisi hazırlamak için 40 g KOH damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti buzdolabında 4 hafta depolanabilir. Barrit (α-naphtol çözeltisi) hazırlamak için 0,5 g α-naphtol, 10 mL %96'lık (absolute) etil alkolde çözündürülür. Her testte taze olarak hazırlanmalıdır.

İnkübasyonun 48. saatinde MR-VP kültüründen 1 mL alınıp 13x100 mm'lik küçük test tüpüne aktarılıp üzerine 0,6 mL α-naphtol çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır. Bunun üzerine 0,2 mL %40 KOH çözeltisinden ilave edilir ve tekrar karıştırılır. 4 saat sonra sonuçlar değerlendirilir. Vişneçürüğü/ kırmızı renk oluşumu pozitif sonucu, sarı renk ise negatif sonucu gösterir.

VP testinde pozitif şahit olarak *Ent. aerogenes*, negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

06.04.03.04. Eijkman Testi

Hollandalı biliminsanı Christiaan Eijkman (1858-1930) tarafından 1906 yılında, asıl amaç olarak suların sıcakkanlı hayvanların dışkıları ile bulaşıp bulaşmadığının kontrolü için önerilmiştir. Günümüzde koliform grup içinde fekal koliformların ayrılması için kullanılır. Testin uygulanışında koliform grup üyesi olduğu bilinen ~18 saatlik aktif ve saf kültür genel ya da koliformlar için selektif bir sıvı besiyerine aşılanıp su banyosunda 44,5±0,2 ºC'ta 24 saat inkübe edilir.

Bu süre sonunda tüpte gelişme olması kültürün fekal koliform olduğunu gösterir. *E coli*, bu testte pozitif şahit olarak kullanılabilir.

Gıdalarda EMS yöntemi ile koliform grup, fekal koliform ve *E. coli* sayımında LST Broth besiyerinde gaz görülen tüplerden içinde Durham tüpü bulunan EC Broth besiyerine aşılama yapılıp 44,5±0,2 ºC'ta 24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyerinde gelişme ve Durham tüplerinde gaz görülen tüpler, fekal koliform olarak değerlendirilir.

06.04.03.05. Sitrat Testi

Besiyeri bileşimindeki sitratın tek karbon kaynağı olarak kullanılıp kullanılamadığının belirlenmesi için yapılan testtir. Sitrat, sitritaz (sitrat-okzalasetat liyaz) veya sitrat dismolaz enzimleri aracılığı ile katabolize olur ve bir dizi reaksiyon sonucunda asetat ve format oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda besiyerinde alkali pH oluşur ve besiyerinin orijinal yeşil rengi maviye dönüşür.

Yaygın uygulama, test tüplerinde yatık agar olarak hazırlanmış Simmons citrate agar besiyerine ~18 saatlik aktif ve saf kültürden platin aşı özesi (ya da cam baget veya tek kullanımlık plastik öze) kullanılarak yüzeye inokülasyon ve uygun sıcaklıkta 48 saat inkübasyon sonunda tüpün renginin incelenmesi şeklindedir. Besiyeri renginin koyu maviye dönüşmesi pozitif, orijinal yeşil renkte kalması negatif sonuç olarak değerlendirilir. Bu besiyerinde sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanamayan bakteriler (örneğin *E. coli*) gelişemez.

Sitrat testinde pozitif şahit olarak *Ent. aerogenes*, negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

06.04.03.06. Malonat Testi

Bakterinin sodyum malonatı karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini belirleyen testtir. Malonat, enzim inhibitörüdür. Malonik asit, kompetitif inhibisyon ile enzimi inaktive eder. Suksinik dehidrogenaz, suksinik asidin fumarik aside dönüşümünde hidrojeni uygun bir akseptöre taşır. Malonik asit, yapısal olarak süksinik aside benzerdir ve enzim üzerindeki aktif bölge için yarışır, enzime tutunur ve aktif bölgeye bağlanır. Böylece enzimin normal substratı olan suksinik asidin oksidasyonu baskılanır.

Bu amaçla kullanılan besiyeri bileşimi, maya ekstraktı 1,0 g $(NH_4)_2SO_4$; 2,0 g K_2HPO_4 0,6 g; KH_2PO_4 0,4 g; NaCl 2,0 g; sodyum malonat 3,0 g; dekstroz 0,25 g; bromotimol mavisi 0,025 g ve saf su 1000 mL şeklindedir. Bileşenler 1000 mL suda çözünür, 13x100 mm boyutlarındaki test tüplerine 3'er mL dağıtılır ve otoklavda 121°C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav çıkışı pH 6,7±0,2'dir.

Testin uygulanışında ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanan besiyeri 37 °C'ta 24-48 saat inkübe edilir. Pozitif sonuç genellikle 24 saatte alınır. Negatif sonuç koşulunda inkübasyona 24 saat daha devam edilir. Besiyerinin yeşil renkten

mavi renge dönüşümü malonat pozitif, orijinal yeşil renkte kalması malonat negatif olarak değerlendirilir.

Malonat testinde pozitif şahit olarak *Ent. aerogenes*, negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

06.04.03.07. Asetamit Testi

Sitrat testinde olduğu gibi, bu besiyeri bileşiminde tek karbon kaynağı asetamittir. *Pseudomonas aeruginosa* ile *Pse. fluorescens* ayrımında kullanılır. Başta içme ve kullanma suyu olmak üzere çeşitli gıda numunelerinin analizlerinde bu iki bakteri birbirine çok benzer koloni oluşturur. Besiyeri bileşimi acetamide 10,0 g; NaCl 5,0 g; K_2HPO_4 1,39 g; KH_2PO_4 0,73 g; $MgSO_4$ 0,5 g; phenol red 0,012 g ve saf su 1000 mL şeklindedir. Bileşenler, gerekirse hafifçe ısıtılarak saf suda çözülür. Kimi kaynaklar 121 °C'ta 15 dk sterilize edileceğini belirtirken kimi kaynaklar besiyerinin fazla ısıtılmasından kaçınılması gerektiğini ve sterilizasyon için membran filtre kullanılmasını önermektedirler. Besiyeri bileşimindeki asetamit zehirlidir, solunmasından sakınılmalıdır. Çeker ocak içinde çalışılmalıdır.

Testin uygulanışında, ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanan besiyeri 37 °C'ta 18-48 saat inkübe edilir. Besiyerinin pembe renkten menekşe-kırmızı renge dönüşümü asetamit pozitif, orijinal pembe renkte kalması asetamit negatif olarak değerlendirilir.

Asetamit testinde pozitif şahit olarak *Pse. aeruginosa*, negatif şahit olarak *Pse. fluorescens* kullanılabilir.

06.04.03.08. Katalaz Testi

Katalaz testi olarak adlandırılan bu test, bakterilerde katalaz enziminin varlığını ya da yokluğunu gösterir. Bütün bakterilerin solunum sisteminde oksijen ve oksidazlar ile indirgenmiş flavoproteinler veya indirgenmiş demir sülfür proteinleri bulunduğunda toksik bileşik olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve superoksit radikali oluşur. H_2O_2, karbohidratların aerobik parçalanması sonucu oluşan son üründür.

İndirgenmiş flavoproteinler, hidrojen peroksit oluşturmak için elektron indirgenmesi aracılığıyla oksijen gazı ile reaksiyon oluşturur. Katalaz, peroksidaz ve superoksit dismutaz (SOD) enzimleri, oksijenin ara ürünlerini katalitik olarak ortadan kaldırır. Bunlardan SOD superoksit anyonları üzerine, katalaz ise H_2O_2 üzerine etkilidir. Her iki enzim de oksijenin toksisitesine karşı hücrenin biyolojik savunmasında önemlidir. Katalaz ve SOD, sitokrom içeren aerobik, fakültatif anaerobik ve aerotolerant solunum yapan bakterilerin çoğunda bulunur. Streptokoklarda katalaz yoktur. Obligat anaeroplarda bu iki enzim eksiktir. Birçok anaerobik bakteri, katalaz yerine peroksidaz enzimine sahiptir. H_2O_2 hücre içinde birikirse toksik olduğu için bakterinin ölümüne neden

olur. Dolayısıyla hücrenin biyolojik savunma mekanizmasına bağlı olarak H_2O_2 hücre içerisinde katalaz veya peroksidaz ile parçalanır.

Testin uygulanışında önerilen besiyeri nutrient agar olmakla birlikte plate count agar veya CASO (tryptic soy) agar gibi diğer genel besiyerleri de bu amaçla kullanılabilir. Tüpte yatık agar ya da Petri kutusundaki agarlı besiyerine ~18 saatlik aktif ve saf kültürden öze ile sürme yapılır, 18-24 saat inkübasyondan sonra ya doğrudan koloni üzerine Pastör pipeti ile %3 derişimdeki hidrojen peroksitten 1 damla damlatılır ya da yatık agar tüpündeki yüzey kültürüne aynı çözeltiden yaklaşık 1 mL eklenir.

Katalaz testi, lam üzerinde de yapılabilir. Bu amaçla, lam üzerine %3 derişimdeki hidrojen peroksitten 1 damla damlatılır, koloni bu damla içinde hızla homojenize edilir. Katalaz testi için %3 derişimde hazırlanmış hazır ticari preparatlar da (örneğin, Bactident Catalase) kullanılabilir.

Tüm uygulamalarda en geç 1 dk içinde gözle görülür gaz çıkışı olursa katalaz testi sonucu pozitif olarak değerlendirilir. Lamda yapılan test sonucu kolay gözlemlenmeyebilir. Bu amaçla büyüteç kullanılabilir.

Katalaz testi her koşulda koloniye uygulanır. Sıvı besiyerinde gelişmiş kültüre katalaz testi yapılamaz.

Katalaz testinde pozitif şahit olarak *Bacillus* spp., negatif şahit olarak *Lactobacillus* spp. kullanılabilir.

06.04.03.09. Oksidaz Testi

Aerop bakterilerde bulunan oksidaz (sitokrom C oksidaz) enziminin varlığını belirlemek için yapılır. Genellikle *Pseudomonas* türlerini *Enterobacteriaceae* üyelerinden ayırmak için kullanılır. ISO 9308-1:2014'e göre suların mikrobiyolojik analizinde koliform bakteri olduğundan kuşkulanılan kolonilere oksidaz testi yapılması gereklidir.

Bütün aerobik bakteriler, çeşitli substratların oksidasyonundan sorumlu bir metabolik yol olan solunum ile enerjilerini kazanırlar. Solunum zincirinde bir dizi enzim aracılığıyla substratlardan moleküler oksijen oluşur. Oksidaz enzimi, substrattan hidrojeni uzaklaştırmayı katalize eder ve hidrojen akseptörü olarak sadece oksijeni kullanır. Sitokrom oksidaz enzim sistemi, sadece aerobik bakterilerde bulunur ve moleküler oksijeni H_2O_2'ye indirgeyen son hidrojen akseptörü olarak hidrojenin kullanımını sağlar. Obligat anaeroplarda sitokrom oksidaz enzimi yoktur ve dolayısıyla atmosferik oksijen varlığında gelişemezler. Fakültatif anaerop olan *Enterobacteriaceae* üyelerinde de sitokrom oksidaz enzimi yoktur, ancak bunlar atmosferik oksijen varlığında gelişebilirler.

Testin uygulanışında koloni doğrudan oksidaz testine alınabilir, ancak tercihen CASO agar, nutrient agar veya plate count agar gibi genel bir agarlı besiyerinde kültürü yapıldıktan sonra oksidaz testine alınmalıdır. Bunun nedeni, özellikle VRB Agar gibi bir besiyerinde gelişmiş koyu kırmızı koloni,

doğrudan oksidaz testine alınırsa koloninin orijinal rengi nedeniyle sahte pozitif sonuç alınabilme endişesidir. Bu, haklı bir endişedir çünkü böylesi koyu kırmızı renkli bir koloni doğrudan oksidaz testine alındığında oksidaz pozitif sonuç olan mavi/ menekşe/ kahverengi renk dönüşümü belirgin olarak izlenemez. Benzer şekilde koloninin rengi, negatif sonucu baskılar. Bir diğer deyiş ile oksidaz negatif bakterilerde bu test sonucunda renk değişikliği olmayacaktır, ancak koloninin orijinal rengi nedeni ile renk dönüşümü olmadığı fark edilemeyecektir.

Testin uygulanışında ikinci önemli konu analizin süresidir. 60 sn'den sonra alınacak pozitif reaksiyon dikkate alınmaz çünkü atmosferik oksijen pozitif sonuca neden olur.

Oksidaz testinde platin öze kullanılmalıdır. Demir ve nikel özeler sahte pozitif sonuca yol açabilir. Laboratuvarda kullanılan özenin platin olup olmadığı bilinmiyorsa cam baget (örneğin cam Drigalski spatülünün sapı) ya da tek kullanımlık plastik öze bu amaçla kullanılabilir.

Oksidaz testi, basit olarak hazır ticari kitlerle (örneğin Bactident Oxidase) yapılabilir. Bu amaçla koloni 1 mL kadar saf suda yoğun bir şekilde çözülüp test şeridinin reaksiyon bölmesine öze ile aktarılır. 60 sn içinde mavi-menekşe renk dönüşümü oksidaz testinin pozitif sonuç verdiğini gösterir.

Test, laboratuvarda hazırlanan çözelti ile de yapılabilir. Bu amaçla 1 g tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür, 100 mL damıtık suda çözülür. Denemelerde taze hazırlanmış çözelti kullanılmalıdır. Hazırlanmış çözelti, buzdolabında 7 güne kadar saklanabilir. Bir parça filtre kâğıdı bu çözelti ile ıslatılır. Bu ıslatma sırasında sahte pozitif sonuçtan sakınmak için filtre kâğıdının mavi/ menekşe/ kahverengi renk vermiyor olmasına dikkat edilmelidir. Temiz bir platin öze yardımıyla koloniden bir miktar alınarak filtre kâğıdının üzerindeki oksidaz test çözeltisi üzerine yayılır. 10 sn içinde gözlenen mavi/ menekşe/ kahverengi renk oluşumu oksidaz pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Yaşlı kültürlerle yapılan test güvenilir sonuç vermez.

Oksidaz testi için pozitif şahit olarak *Pseudomonas* spp., negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

06.04.03.10. Karbohidrat Testleri

Mikroorganizmalar, çeşitli enzimlerin varlığına bağlı olarak karbohidratları karbon kaynağı olarak kullanabilir ya da kullanamaz. Bu özellikleri sayesinde karbohidrat testleri bakterilerin tanımlanmalarında sıklıkla kullanılır.

Belirli bir karbohidratın karbon kaynağı olarak kullanılması sonunda asidik ürünler ortaya çıkar. Oluşan bu asitlik, basit olarak pH indikatörünün renk değiştirmesi ile belirlenir. pH indikatörü, yukarıda metil red testi bölümünde anlatıldığı şekilde inkübasyon sonunda kültüre ilave edilebileceği gibi doğrudan ve yaygın olarak kullanıldığı şekliyle besiyeri bünyesinde de yer alabilir.

Karbohidratlardan asit oluşturma testleri, yaygın olarak şeker testleri olarak da anılır. Ancak sorbitol ve mannitol gibi şeker alkollerin de bu testlerde kullanıldığı göz önünde tutulmalıdır.

Bu testler basit olarak bileşiminde pepton, test edilecek karbohidrat ve pH indikatörü olan besiyerlerinde yapılır. Bu amaçla "phenol red broth base", en yaygın olarak kullanılan besiyeridir. Başka besiyerleri de bu amaçla kullanılabilirse de bazal besiyeri bileşiminde fermente olabilir şeker olmamalıdır. Örneğin, CASO brotha test edilecek karbohidrat ve phenol red indikatörü eklenerek bu amaçla kullanılamaz, çünkü CASO broth bileşiminde glikoz vardır. Test edilen bakteri, test edilen karbohidratı kullanamasa bile glikozdan asit oluşturacak ve bütün test sonuçları pozitif olarak alınacaktır.

Bazı uluslararası standartlar, denenecek karbohidratın filtre ile sterilize edilmesini ve bazal besiyerinin sterilize edildikten sonra karbohidratın eklenmesini önerirler. Bazı kaynaklar ise test edilecek karbohidratın bazal besiyerine katılıp tüplere 3-4 mL dağıtıldıktan sonra otoklavda 118 ^{o}C'ta 10 dk süre ile sterilize edilebileceğini belirtir. Karbohidratların filtre ile sterilize edildikten sonra bazal besiyerine eklenmesi, besiyeri hazırlama yaklaşımı ile daha doğrudur, ancak bu uygulamada kontaminasyona çok dikkat edilmelidir.

Karbohidrat testlerinde dikkat edilmesi gereken önemli bir konu, düşük karbohidrat derişimine bağlı olarak alınan sahte negatif sonuçlardır. Bazı bakterilerin karbohidratları kullanma aktivitelerinin yanı sıra proteolitik aktiviteleri de çok yüksektir.

Bunlar, karbohidratları çok kısa bir sürede kullanarak besiyeri pH'sını hızla düşürürler ve pH indikatörü olan fenol red sayesinde kırmızı olan besiyeri rengi sarıya döner. Karbohidratın tükenmesinden sonra bakteri, karbon kaynağı olarak besiyeri bileşimindeki peptonları kullanmaya başlar ve bu kez alkali ürünlerin oluşumu nedeni ile pH yükselir ve renk tekrar kırmızıya döner. Bu sahte negatif sonuçlardan sakınmak için karbohidrat fermantasyon testlerinde reaksiyon 4'er saat aralılarla sık sık kontrol edilmeli ya da test edilen karbohidrat, tümü tüketilemeyecek olan %1 derişimde tutulmalıdır.

Karbohidrat testleri bu şekli ile yapıldığı gibi VRB agar, VRBD agar, triple sugar iron agar, sorbitol MacConkey agar ve Kligler iron agar gibi besiyerleri de bir anlamda karbohidratların kullanımı üzerine tanımlama ya da selektif izolasyon ve/veya sayım amacıyla geliştirilmişlerdir. Örneğin, VRB agar besiyerinde laktozu kullanabilen koliform grup bakteriler, laktozdan asit oluşturmakta ve oluşan bu asitlik pH indikatörü ile koloninin koyu kırmızı renk almasını sağlar. Bir diğer deyiş ile VRB agar besiyerinde 37 ^{o}C'ta 18-24 saat inkübasyon sonunda oluşan koyu kırmızı renkli koloniler laktoz pozitif bakterilere aittir. Triple sugar iron agar sadece *Salmonella* tanımlanmasında kullanılan bir besiyeri olup test edilen bakterinin laktoz ve sakkaroz negatif ama glikoz pozitif olup olmadığının belirlenmesi için kullanılır. Sorbitol MacConkey (SMAC) agar besiyeri ise *E. coli* O157:H7 analizinde kullanılır. Sorbitol negatif olan *E. coli*

O157:H7 serotipi, sorbitolü kullanıp asit oluşturamadığı için renksiz koloniler yapar.

Genel yaklaşım ile karbohidrat testleri, belirli bir karbohidratın karbon kaynağı olarak kullanılıp kullanılamadığının belirlenmesi için asit oluşturma esaslı tanımlama testleri olmakla birlikte bunun ötesinde belirli bir karbohidratın kullanımı ve devamında gaz oluşturma testleri için de kullanılabilir. Bu amaçla, phenol red broth base besiyerine standart şekilde karbohidrat eklenir, tüplere Durham tüpü koyulur ve sterilize edilir. Besiyeri ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanıp inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda, asit oluşmuş tüplerde ilave olarak gaz oluşup oluşmadığının kontrolü yapılır. Gaz oluşturma testlerinde de pozitif ve negatif şahit kullanılması gereklidir.

Gaz testleri phenol red broth base besiyerinde Durham tüpü ile yapılabileceği gibi *Salmonella* analizinde kullanılan triple sugar iron agar besiyerinde de yapılabilir. Yatık agar olarak hazırlanan bu besiyerinde inokülasyon ve inkübasyon sonunda besiyerinde gaz yarıkları oluşması *Salmonella* için glikozdan gaz oluşturma testi pozitif olarak değerlendirilir. *Salmonella* tipik olarak glikozdan gaz oluşturur, ancak glikozdan gaz oluşturmayan serotipleri de vardır. Glikozdan gaz oluşturma testi Kligler iron agar besiyerinde de yapılabilir. İnokülasyon ve inkübasyon sonunda besiyerinde oluşan gaz, glikozdan gaz oluşturulduğu şeklinde değerlendirilir.

Karbohidrat testlerinde OF (Oxidation-Fermentation) Medium da kullanılır.

Laktobasillerin tanımlanmasında da karbohidrat testleri kullanılır. Bu amaçla MRS broth besiyeri bileşimden hazırlanır ve bileşimdeki 20 g/L glikoz yerine test edilecek karbohidrat ilave edilir.

06.04.03.11. Bile Eskulin Hidroliz (Eskulin Hidroliz) Testi

Bakterilerin safra tuzları varlığında bir glikozit olan eskulini eskuletin ve glikoza hidrolize edebilme yeteneğini belirleyen testtir. Eskulin testinin temeli eskulinin yapısal enzim β-glukozidaz (eskulinaz) ile eskuletin ve glikoza hidrolize olmasıdır. En yaygın kullanım şekli ile eskuletin, demir III tuzları ile koyu kahve/ siyah renkli fenolik kompleks oluşturur. Eskulin hidrolizi iki aşamalıdır. Belirli safra tuzları derişiminde bakteri gelişir ve sonrasında eskulini hidrolize etmek için eskulinaz enzimini sentezler. Bu test, *Listeria* ve *Enterobacteriaceae* üyeleri ile özellikle *Enterococcus* (D grup streptokokların) tanımlanmasında ve ayrımında kullanılır.

Bu test ile ilgili olarak pek çok besiyeri önerilmiş olmakla beraber gıdalardan elde edilen ve mikroskobik olarak streptokok görüntüsünde olan izolatların enterokok olup olmadığının kontrolü için kanamycin esculine azide agar kullanılabilir.

Testin uygulanışı için ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanan besiyeri 35-37 ºC'ta 24-48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası besiyerinde siyahlaşma olursa eskulin pozitif, siyahlaşma yoksa eskulin negatiftir.

Mikroskobik morfolojisi streptokok olan bir izolatın enterokok olup olmadığının kontrolü için farklı ve daha basit testler (%0,1 metilen mavisinde gelişme, %6,5 NaCl ortamında gelişme ve 45 ºC'ta gelişme) uygulanabilir. Eğer, enterokok dışında *Listeria* ve *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanması için bu test uygulanacaksa çeşitli bilimsel kaynaklarda önerilen hazır besiyerleri kullanılabilir ya da besiyeri laboratuvarda formülden hazırlanabilir.

Eskulin testinde pozitif şahit olarak *Ent. aerogenes*, negatif şahit olarak *Citr. freundii* kullanılabilir.

06.04.03.12. Jelatini Sıvılaştırma Testi

Bakterilerin proteolitik bir enzim olan jelatinaz üretme yeteneğini belirleyen bir testtir. Jelatinaz enzimine sahip bakteriler, jelatini hidrolize ederek sıvılaştırır. Proteinler, bakteri hücresine giremeyecek kadar büyüktür. Hücrenin proteinleri parçalayabilmesi için öncelikle büyük moleküllerin daha küçük bileşenlere katabolize edilmesi (parçalanması) gerekir. Belirli bakteriler tarafından hücre dışı olarak salgılanan jelatinazlar, proteinleri iki aşamada olmak üzere önce polipeptitlere daha sonra aminoasitlere parçalar. Analizde kullanılan besiyerinin bileşimi et ekstraktı 3,0 g; pepton 5,0 g; jelatin 120,0 g ve saf su 1000 mL şeklindedir. Bileşenler suda çözünür, 13x100 mm boyutlarındaki test tüplerine 3'er mL dağıtılır ve otoklavda 115 ºC'ta 10 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası pH 7,0±0,2'dir.

Testin uygulanmasında ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanan jelatin besiyeri, 25 ºC'ta 6 haftaya kadar inkübe edilir. İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan sıvılaşma mikroorganizmanın jelatini kullandığının göstergesidir.

Cl. perfringens gibi jelatini eritme testi yapılacak bakterinin 37 ºC'ta inkübe edilmesi gerekli ise test bu sıcaklıkta sürdürülür, inkübasyon sonunda tüp, 4 ºC'a soğutulup kontrol edilir. Besiyeri katı ise jelatin sıvılaştırma testi negatif, sıvı ise pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

Jelatinaz testinde pozitif şahit olarak *Proteus vulgaris*, negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

06.04.03.13. Dekarboksilaz ve Dihidrolaz Testleri

Bakterilerin belirli aminoasitleri dekarboksile etme yeteneğini belirleyen testlerdir. Dekarboksilaz enzimini üretebilen bakteriler, aminoasitlerdeki karboksil (–COOH) ucunu parçalayarak amin veya diamin ve CO_2 oluşturur. Bu oluşum, alkali reaksiyon ile sonuçlanır.

Substrata özgü çeşitli dekarboksilaz enzimleri vardır. Bakterilerin biyokimyasal olarak tanımlanmasında en çok kullanılanlar lisin, ornitin ve arjinin dekarboksilaz enzimleridir. Bunlar, adaptif veya indüklenmiş enzimlerdir ve sadece spesifik substrat varlığında ve asit ortamda gelişebilen bakteriler tarafından üretilirler. Aminoasitlerin parçalanması anaerobik olarak oluşur. Lisinin dekarboksilasyonu sonucunda kadaverin, ornitinin dekarboksilasyonu ile putresin ve arjininin dekarboksilasyonu sonucu agmatin oluşur. Arjinin, ayrıca dehidrolaz enzimi ile katabolize olarak ornitin, NH_3 ve CO_2 oluşturur. Daha sonra ornitin, dekarboksilasyon ile putresine dönüşür.

Analizde kullanılan bazal besiyeri bileşimi, pepton 5,0 g; maya ekstraktı 3,0 g; dekstroz 1,0 g; bromocresol purple 0,02 g ve saf su 1000 mL şeklindedir. Bu bileşime %0,5 oranında L- formdaki aminoasit (lisin ya da arjinin veya ornitin) eklenir. Kontrol olarak kullanılacak tüplere aminoasit eklenmez. Bileşenler suda çözülür, tüplere 5'er mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir.

Testin uygulanışında aminoasit içeren test tüpü ve içermeyen kontrol tüpü, ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanıp anaerobik atmosferde 37 ºC'ta 24 saat inkübe edilir. Bakteri, önce glikozu kullanır ortamda belirli bir asitlik oluşur ve besiyerinin rengi sarıya dönüşür. Sonra pH 6'dan daha düşük asit ortamda dekarboksilaz pozitif olan bakteriler, dekarboksilaz enzimini sentezleyerek aminoasidi dekarboksile eder. İnkübasyon sonrası aminoasit içeren besiyeri orijinal menekşe renginde ve kontrol besiyeri sarı renkli ise dekarboksilaz pozitif olarak, eğer her iki tüp de sarı renkli ise dekarboksilaz negatif olarak değerlendirilir. Ayrıca her iki tüpte gelişme olmasına rağmen renk değişimi yok ise (orijinal menekşe renk korunmuş ise) dekarboksilaz negatiftir. Aşağıda anaerobik inkübasyon sonrası test ve kontrol tüpündeki renk değişmelerine göre pozitif ve negatif reaksiyonlar özetlenmiştir.

Test	Kontrol	Sonuç
Menekşe	Sarı	Pozitif
Sarı	Sarı	Negatif
Menekşe	Menekşe	Negatif

Dekarboksilaz testlerinden lisin dekarboksilaz, en yaygın olarak *Salmonella* spp. tanımlamasında ve lysine iron agar kullanılarak yapılır.

Dekarboksilaz testlerinde pozitif ve negatif şahit olarak aşağıdaki bakteriler kullanılabilir.

Bakteri	Lisin	Ornitin	Arjinin
Klebsiella pneumoniae	+	–	–
Enterobacter cloacae	–	+	+

-Not 1: İnkübasyon en az 18 (tercihen 24) saat sürmelidir. Dekarboksilaz pozitif bakteriler, önce glikozdan asit oluşturdukları için dekarboksilaz pozitif ve

negatif tüm tüpler yaklaşık 10 saat sonra sarı olur. Dekarboksilaz pozitif olanlarda renk daha sonra menekşeye döner.

-Not 2: Tanımlaması yapılacak izolatın *Enterobacteriaceae* üyesi olduğu kesin olarak biliniyorsa (örneğin VRBD agar besiyerinden izole edilmiş tipik koloni ise) kontrol olarak aminoasit içermeyen ikinci tüpün kullanılması şart değildir, çünkü *Enterobacteriaceae* üyelerinin tümü glikoz pozitiftir.

-Not 3: Bu test, anaerobik koşullarda yapılır. Aşılama sonrası tüplerin üzerine 0,5 cm olacak şekilde otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilmiş sıvı parafin eklenir ve sonra inkübasyona bırakılır.

06.04.03.14. Fenilalanin Deaminaz Testi

Bakterinin fenilalanin aminoasidini enzimatik olarak fenilpirüvik aside deamine etme yeteneğini belirleyen testtir. Aromatik bir aminoasit olan fenilalanin, oksidatif olarak aminoasit oksidaz enzimi ile deamine olur ve fenilpirüvik asit ile amonyak oluşur. $FeCl_3$, fenilpirüvik asit ile şelat oluşturarak yeşil rengin ortaya çıkmasını sağlar.

Analizde kullanılan besiyerinin bileşimi maya ekstraktı 3,0 g; DL-fenilalanin 2,0 g; Na_2HPO_4 1,0 g; NaCl 5,0 g; agar 12,0 g ve saf su 1000 mL şeklindedir. Bileşenler suda çözünür, agar eriyinceye kadar 1-2 dk kaynatılır, 13x100 mm boyutlarındaki test tüplerine 4'er mL dağıtılır ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası pH 7,3±0,2'dir. Otoklav çıkışı tüpler yatık agar olarak jelleştirilir.

Demir klorür çözeltisi hazırlamak için 10 g $FeCl_3$, 100 mL saf suda çözülür.

Testin uygulanışında, ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanan besiyeri, 37 ºC'ta 24-48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası %10'luk $FeCl_3$ çözeltisinden yatık agar yüzeyine Pastör pipeti ile 2-3 damla ilave edilir. Yeşil renk oluşumu pozitif sonucun göstergesidir.

Fenilalanin deaminaz testi için pozitif şahit olarak *Proteus vulgaris*, negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

06.04.03.15. Double Sugar (Kligler) Iron Agar Testleri

Bakterilerin glikoz ve laktozu kullanma ve hidrojen sülfür üretme yeteneğini belirlemek amacıyla iki şekerli (double sugar) besiyerinde gerçekleştirilen testlerdir. Kligler iron agar %1,0 oranında laktoz ve %0,1 oranında glikoz içerir. Özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanmasında kullanılan kombine bir besiyeridir. *Enterobacteriaceae* üyelerinin tamamı glikozu fermente ederken laktozu bazıları kullanır, bazıları kullanamaz. Glikozu kullanamayan suşlar *Enterobacteriaceae* üyesi değildir. Bakterinin laktozu kullanabilmesi için intraselüler bir enzim olan β-D-galaktozidaz gereklidir. Bu enzim, laktozu glikoz ve galaktoza hidrolize eder. Glikozu kullanabilen bakteriler, asitlik oluştururken bir kısmı ise asitlik ile beraber gaz da oluşturur. Ayrıca bu besiyerinde hidrojen

sülfür oluşumu da değerlendirilir. Besiyerinde var olan tiyosulfat, tiyosulfat redüktaz enzimi ile sülfit ve hidrojen sülfüre ayrılır. H_2S, renksiz bir gazdır ve demir amonyum sitrat ile reaksiyona girerek tüpün dibinde siyah renk oluşturur.

Kligler iron agar besiyeri 55 g/L olacak şekilde hazırlanır, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında tüm bileşenler eriyinceye kadar ısıtılır ve 16x160 mm boyutlarındaki standart deney tüplerine 7'şer mL dağıtılır. Otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık agar şeklinde hazırlanır. Otoklav sonrası pH 7,4±0,2'dir.

Testin uygulanışında ~18 saatlik aktif ve saf kültür, Kligler iron agar besiyerinin yüzeyine öze ile sürülür ve aşı iğnesi ile tüpün ortasından dibine doğru batırılır. 37 ºC'ta 18-24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda tüpün dip kısmında oluşan sarı renk glikozdan asit oluşumunu, ayrıca tüpün dip kısmında oluşan hava kabarcıkları ya da gaz yarıkları veya besiyerinin yukarı doğru itilmesi glikozdan gaz oluşumunu gösterir. Tüpün dip kısmında oluşan siyahlaşma, H_2S oluşumuna işaret eder. Bazen tüpün dibinde oluşan bu siyah renk, asit oluşumunu gösteren sarı rengi maskeler. Tüpün yüzey kısmında oluşan sarı renk laktozun kullanıldığını (laktoz pozitif sonuç), kırmızı/ pembe renk ise laktozun kullanılmadığını (laktoz negatif sonuç) gösterir.

Kligler iron agar testlerinde bütün *Enterobacteriaceae* üyeleri glikozdan asit oluştururken bazıları glikozdan gaz oluşturur bazıları oluşturamaz. H_2S oluşumu için pozitif şahit olarak *Salmonella* spp., negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir. Laktozun fermente edilme testinde ise bunun tersine pozitif şahit olarak *E. coli*, negatif şahit olarak *Salmonella* spp. kullanılabilir.

06.04.03.16. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testleri

Triple sugar iron agarın Kligler iron agardan farkı bu besiyerinin, glikoz ve laktoz dışında sakkaroz da içermesidir. Triple sugar iron agar besiyeri, günlük uygulamada genellikle *Salmonella* spp.'ye özgü besiyeridir. *Shigella* spp. için de kullanılabilir. *Salmonella* spp. laktozu ve sakkarozu kullanamadığı için inkübasyon sonunda besiyeri yüzeyi orijinal pembe-kırmızı rengini korur. Eğer besiyeri yüzeyi inkübasyon sonunda sarı renk alırsa test edilen bakteri, laktoz ve/veya sakkarozu kullanmıştır dolayısıyla *Salmonella* spp. değildir.

Triple sugar iron agar besiyeri, 65 g/L olacak şekilde hazırlanır, kaynar su banyosu ya da mikrodalga fırında tüm bileşenler eriyinceye kadar ısıtılır ve 16x160 mm boyutlarındaki standart deney tüplerine 7'şer mL dağıtılır. Otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık agar şeklinde hazırlanır. Otoklav sonrası pH 7,4±0,2'dir.

Testin uygulanışında ~18 saatlik aktif ve saf kültür, triple sugar iron agar besiyerinin yüzeyine öze ile sürülür ve aşı iğnesi ile tüpün ortasından dibine doğru batırılır. 37 ºC'ta 18-24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda tüpün dip kısmında oluşan sarı renk, glikozdan asit oluşumunu ayrıca tüpün dip kısmında oluşan hava kabarcıkları ya da gaz yarıkları oluşması veya besiyerinin yukarı

doğru itilmesi glikozdan gaz oluşumunu gösterir. Tüpün dip kısmında oluşan siyahlaşma H_2S oluşumuna işaret eder. Bazen tüpün dibinde oluşan bu siyah renk, asit oluşumuna bağlı olan sarı rengi maskeler. Tüpün yüzey kısmında oluşan sarı renk laktoz ve/veya sakkarozun kullanıldığını, orijinal kırmızı/ pembe renk ise laktozun ve sakkarozun kullanılmadığını gösterir. *Salmonella* spp. için tipik reaksiyon, glikozdan gaz ve asit oluşturma ile H_2S oluşturma pozitif, laktoz ve sakkarozu kullanma test sonucu negatiftir.

Not 1: *S.* Typhi ve *S.* Gallinarum glikozdan gaz oluşturmaz.

Not 2: Geç laktoz pozitif *Salmonella* serotipleri vardır. Bu nedenle, inkübasyon süresi tipik olarak 24 saattir, 48 saati geçmemelidir.

06.04.03.17. Üreaz Testi

Bazı bakterilerde üreyi hidrolize eden üreaz enziminin varlığını saptamak amacıyla yapılır. Bu test asıl olarak *Salmonella* ile selektif besiyerlerinde *Salmonella* serotiplerine benzer koloni morfolojisi gösteren *Proteus* türlerinin ayrılması için kullanılır. Üre, spesifik enzim üreaz tarafından hidrolize olur ve besiyeri bileşimindeki pH indikatörü aracılığı ile pembe-kırmızı renk oluşur (pozitif reaksiyon).

Bu test için tipik *Salmonella* morfolojisindeki ~18 saatlik aktif ve saf kültür, tercihen filtre ile sterilize edilmiş urea broth besiyerine inoküle edilir. 37 ºC'ta 48 saate kadar süren inkübasyon sonunda besiyerinin orijinal portakal kırmızısı renginin sarıya dönüşmesi negatif (örneğin, *Salmonella* spp.), kırmızıya dönüşmesi (örneğin *Proteus*) pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir.

Üreaz testi yapılırken 4 adet urea broth besiyeri hazırlanır. Bunlardan birincisine bakteri aşılanmaz ve inkübasyon sonunda orijinal portakal kırmızısı rengin korunduğu izlenir (şahit tüp). İkincisine test edilecek kültür, üçüncüsüne üre negatif olan *E. coli* (negatif sonuç) ve dördüncüsüne üre pozitif olan *Proteus* spp. inoküle edilir. İnkübasyon sonunda bu dört tüpün renk değerlendirilmesi beraberce yapılır. *Salmonella*, üre negatif bir bakteridir.

Üreaz testi, steril küçük tüplere filtre ile sterilize edilmiş urea brothtan 2 mL olacak şekilde hazırlanması ve bu besiyerine şüpheli/ tipik koloninin yoğun inokülasyonu ile hızlı şekilde de yapılabilir. 4 saat sonunda pozitif sonuç veren kültür *Salmonella* değildir, başka teste gerek duyulmaz.

06.04.03.18. β-Galactosidase (ONPG) testi

o-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG) bileşiği kullanılarak β-galaktozidaz enziminin varlığı ya da yokluğu kontrol edilebilir. Bakteriyel enzimler, yapısal veya adaptif enzimler olarak sınıflandırılır. Adaptif veya indüklenebilir enzimler sadece spesifik substrat bulunduğu zaman sentezlenebilirler. Yapısal enzimler ise substrat olsun ya da olmasın bakteri tarafından üretilir. β-galaktozidaz indüklenebilir enzimdir. İndüklenebilen enzimler genetik olarak kontrol edilir. Ancak substrat uzaklaştırıldığında

indükleyici enzimler birkaç jenerasyondan sonra hücrede azalır. β-D-galaktozidaz, laktoz ve diğer β-galaktozitlerin hidrolizi ile ilişkili intraselüler bir enzimdir. Laktozu glikoz ve galaktoza hidrolize eder. Besiyerine laktoz ilave edildiğinde üç enzim sentezlenir: Laktoz permeaz, β-galaktozidaz ve asetiltransferaz. Laktoz permeaz, laktozun hücre içine taşınmasını sağlarken β-galaktozidaz, laktozu glikoz ve galaktoza hidrolize eder. Bazı bakteriler laktozu yavaş veya geç fermente ederler. Bunlar ONPG pozitiftir ve permeaz enzimleri yoktur, ama β-galaktozidaz enzimine sahiptirler. ONPG testi genellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanmasında kullanılır.

ONPG çözeltisi hazırlamak için 0,15 g ONPG, 25 mL 0,01 M sodyum fosfat buffer (pH= 7,5)[10] içinde çözülür ve 0,45 µm porlu membran filtreden geçirilerek steril bir kaba alınır.

Bu çözelti, steril vida kapaklı tüplere ~2,5 mL olarak dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri buzdolabında ve ONPG çözeltisi ışığa duyarlı olması nedeni ile ışık almayacak şekilde 1 ay depolanabilir.

Testin uygulanışında ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile yoğun (4-5 öze dolusu) inokülasyon ve 37 ºC'ta 24 saat inkübasyondan sonra tüplerin rengi kontrol edilir. Sarı renk, ONPG pozitif; açık sarı ya da renksiz tüpler, ONPG negatif olarak değerlendirilir.

ONPG testi, mikroorganizmalardaki β-galaktozidaz enzimini tespit ederek bu enzimi taşıyan bakterilerin gerçek laktoz negatif bakterilerden ayırt edilmesini sağlar. ONPG, yapısal olarak laktoza benzeyen renksiz bir maddedir ve testte β-galaktozidazın substratı olarak kullanılır. ONPG, hücre içine laktozdan daha kolay geçebilir. Permeazın etkin olmadığı hallerde dahi bakteri hücresi içine alınır. Eğer hücrede β-galaktozidaz mevcutsa hidrolize edilir ve galaktoz ile sarı renkli bir madde olan *o*-nitrofenol'e ayrılır.

ONPG testinde pozitif şahit olarak *E. coli*, negatif şahit olarak *Proteus mirabilis* kullanılabilir.

06.04.03.19. Hidrojen Sülfür Oluşumu

Bakterilerin sistin ve sistein gibi kükürt içeren aminoasitlerden ya da sülfatlardan H_2S oluşturup oluşturamadıkları bu test ile belirlenir. Bakterilerin oluşturduğu H_2S, besiyeri bileşimindeki demir ile birleşerek siyah renkli demir sülfüre dönüşür. Buna göre besiyeri renginin siyaha dönüşmesi H_2S oluşturulduğunu gösterir. *Salmonella* analizinde tipik reaksiyonlardan birisidir.

[10] 0,01 M sodyum fosfat buffer (pH= 7,5) hazırlamak için 1,42 g Na_2HPO_4 tartılıp saf su ile 10 mL'ye tamamlanır (A çözeltisi). 1,2 g NaH_2PO_4 tartılıp saf su ile 10 mL'ye tamamlanır (B çözeltisi). 8,095 mL A çözeltisi ile 1,905 mL B çözeltisi karıştırıldığında 10 mL ve pH 7,5 olan 1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi elde edilir. Bu çözeltiden 1 mL alınıp 100 mL balon jojeye aktarılır ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak 0,01 M sodyum fosfat tampon çözeltisi elde edilir.

Bu test, sadece *Salmonella* için değil aynı zamanda diğer pek çok bakterinin tanımlanmasında kullanılan basit bir testtir. H_2S testi, Kligler iron agar ve SIM medium gibi besiyerlerinde yapılabilir. Triple sugar iron agar besiyeri sadece *Salmonella* analizi için geliştirilmiş olmakla beraber diğer reaksiyonlara bakılmaksızın diğer bakterilerin analizinde sadece bu test için kullanılabilir.

H_2S, anaerobik reaksiyon sonunda oluşur. Buna bağlı olarak test edilecek kültür, aşı iğnesi ile tüpte bulunan katı ya da yarı katı (SIM medium) besiyerinin dibine kadar daldırılır. Reaksiyon, tüpün dibinde gözlenir. İnkübasyon sonunda tüpün dibinde siyah renk oluşumu pozitif sonucu gösterir.

H_2S testinde pozitif şahit olarak *Salmonella* spp., negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

06.04.03.20. SIM Medium Testleri

Genellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanmasında kullanılan yarı katı kombine besiyeridir. Tek tüpte H_2S oluşumu, indol oluşumu ve hareket testi yapılır. 30 g/L olarak hazırlanan SIM medium, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında bileşenler iyice eritildikten sonra 16x100 mm kısa boylu deney tüplerine yaklaşık 4 cm yükseklik olacak şekilde dağıtılır, otoklavda 121 ^oC'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrasında tüpler dik olarak katılaşmaya bırakılır.

Testin uygulanışında ~18 saatlik aktif ve saf kültür, aşı iğnesi ile SIM medium besiyerinin ortasından dibine kadar daldırılıp 37 ^oC'ta 18-24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda tüpte kararma olması H_2S pozitif, olmaması H_2S negatif; tüpün her yerinde gelişme olması hareket pozitif, sadece aşılama hattında gelişme olması hareket negatif olarak değerlendirilir. Son olarak Pastör pipeti ile birkaç damla Kovacs' indol ayıracı damlatılıp indol testi yapılır.

SIM Medium testlerinde yukarıda ilgili bölümlerde verilen bakteriler kontrol olarak kullanılabilir.

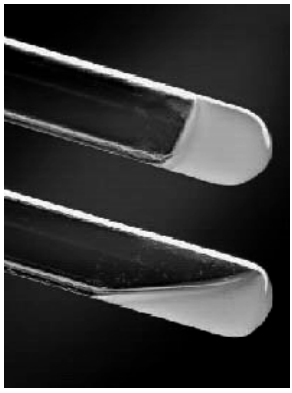
06.04.03.21. Koagülaz Testi

Özellikle *Staphylococcus aureus* için yapılan bir testtir. Çok genel bir yaklaşım ile koagülaz enzimine sahip olan stafilokokların patojen olduğuna karar verilir. Diğer bir yaklaşım ile selektif bir katı besiyerinden izole edilen ve tipik koloni yapısı ile *Staph. aureus* olduğundan kuşku duyulan ve mikroskobik morfolojisi de stafilokok olan izolat, koagülaz pozitif sonuç verirse bunun patojen *Staph. aureus* olduğuna karar verilir. Koagülaz negatif *Staph. aureus* suşları da vardır. Çeşitli ulusal ve uluslararası gıda kodekslerinde sadece koagülaz pozitif *Staph. aureus* dikkate alınır.

Koagülaz, fibrinojeni fibrin oluşturmak üzere aktive ederek pıhtı oluşmasını sağlar. Hücre tarafından ortama salındığı için serbest koagülaz olarak tanımlanır. *Staph. aureus* hücre duvarında bağlı koagülaz (kümelenme/ clumping faktörü) olarak bilinen ve fibrinojen bağlayıcı bir yüzey reseptörü de

bulunur. Serbest koagülaz analizi tüpte yapılırken klinik mikrobiyoloji uygulamalarında genellikle bağlı koagülaz analizi yapılır ve bu test lam üzerinde kümeleşmenin gözlenmesi ile gerçekleştirilir.

Baird-Parker agar veya mannitol salt phenol red agar gibi *Staph. aureus* için kullanılan selektif besiyerinde gelişen tipik morfolojideki *Staph. aureus* kolonileri, brain heart brothta 37 °C'ta 24 saat inkübe edilir ve inkübasyondan sonra bu kültürden 0,1 mL alınıp üzerine 0,3 mL sulandırılmış plazma (örneğin Bactident Coagulase) eklenir ve 37 °C'ta inkübasyona bırakılır. Her saat, tüpte pıhtılaşma olup olmadığı tüpü yavaşça eğerek kontrol edilir, ancak bu kontrol sırasında tüpün fazla eğilmemesine ve karıştırılmamasına özen gösterilmelidir. En geç 4 saat sonra tüpte belirgin pıhtı oluşumu (%75 pıhtı) pozitif olarak değerlendirilir. Şekil 06.04'te üstteki tüp koagülaz pozitif, alttaki tüp koagülaz negatif olarak değerlendirilir.



Şekil 06.04. Tüpte Koagülaz testi. Kaynak: www.mikrobiyoloji.org)

Tüpte koagülaz testi yapılırken inkübasyon 4 saati geçmemelidir. Aksi halde *Staph. aureus* fibrinolizinleri oluşan pıhtıyı eritebilir ve sahte negatif sonuç alınır. Mesai saatleri vb. nedenlerle inkübasyon daha uzun sürmek zorunda ise tüpler 37 ºC yerine 22-25 ºC'ta 24 saat inkübe edilebilir. Bu uygulamanın koagülaz testi için daha duyarlı olduğu belirtilmektedir. Koagülaz test tüpleri 37 ºC'ta 24 saat inkübe edildi ise tüplerin üzerine %5'lik $CaCl_2$ çözeltisinden Pastör pipeti ile birkaç damla ilave edilir. Bu işlem sonrasında tüpte pıhtı oluşursa test sonucu koagülaz negatif, pıhtı oluşmazsa fibrinolizinlerin oluşan pıhtıyı erittiği kabul edilir ve test sonucu koagülaz pozitif olarak değerlendirilir.

Baird-Parker Agar besiyerine yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu yerine tavşan plazması eklenerek hazırlanan besiyeri, uluslararası standartlarda yerini almıştır (ISO 6888-2:1999). Buna göre, ekim ve inkübasyon sonunda lesitinaz aktivitesi yerine doğrudan koagülaz aktivitesi belirlenerek hızlı sonuç alınması sağlanır. Analiz edilen gıda numunesinde *Staph. aureus* beklenmiyorsa bu besiyerinin kullanılması gereksiz yere laboratuvar giderlerini yükseltir.

06.04.03.22. Deoksiribonükleaz (DNAse) Testi

Bakterilerin ve özellikle *Staph. aureus* izolatlarının DNA'yı parçalayan deoksiribonükleaz (DNAse) enzimini üretme yeteneğini belirleyen bir testtir. DNAse, DNA'nın hidrolizine neden olan ekstraselüler bir endonükleazdır. *Staph. aureus* ve *Staph. epidermidis*, ekstraselüler DNAse üretir, ancak *Staph. aureus*, yüksek DNAse aktivitesine sahiptir. DNAse testi, patojen *Staph. aureus* belirlenmesi için kullanılır. DNAse, DNA'yı parçalar. Sıcaklığa dirençlidir ve koagülaz aktivitesi ile arasında ilgileşim (korelasyon) vardır.

Bu analizde DNAse test agar kullanılır. Testin uygulanışında, ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanan DNAse besiyeri, 37 ºC'ta 24-48 saat inkübe edilir.

İnkübasyon sonrasında sürme yapılan bölgeyi kaplayacak şekilde üzerine 1 N HCl damlatılır. Berrak zon oluşumu DNase pozitif, oluşmaması DNAse negatif olarak kaydedilir.

DNAse testinde pozitif şahit olarak koagülaz pozitif *Staph. aureus* ve negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.

06.04.03.23. CAMP Testi

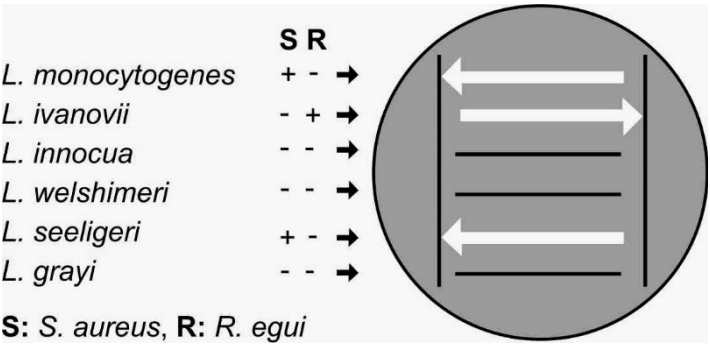
Listeria türlerinin tanımlanmasında önemli bir yer tutan Christie, Atkins ve Munch-Peterson[11] (CAMP) testi, hemoliz reaksiyonunu değerlendirmek için uygulanan bir testtir. Klinik mikrobiyolojide *Streptococcus agalactiae (*grup B) için tipik bir reaksiyondur ve sadece *Staph. aureus* kullanılarak uygulanır.

Gıda mikrobiyolojisinde bu test, selektif *Listeria* katı besiyerlerinden izole edilen tipik *Listeria* spp. ve özellikle *L. monocytogenes* izolatlarının tür bazında tanımlanması için kullanılır. *L. monocytogenes*, eritrositleri lize eden hemolisin üretir. Ancak çoğu *Listeria* izolatı, kanlı agarda gözle belirgin şekilde görülebilecek hemoliz yapamaz. *Staph. aureus* ya da başka türler de *Rhodococcus equi* ile sinerji oluşarak hemoliz belirginleşir. Tüm biyokimyasal testlerde olduğu gibi bu testte de ~18 saatlik aktif ve saf kültürler kullanılır. *Staph. aureus* ve *Rho. equi* kültürleri, defibrine koyun kanı ile hazırlanan kanlı agar besiyerine birbirine paralel ve zıt kutuplarda olacak şekilde çizgi ekim tarzında bir hat boyunca ekilir. İnokülüm ince ve düz olmalıdır. Bunun için inokülasyon özesi agara dik açı yapacak şekilde tutulur. Test yapılacak izolatlar benzer şekilde dik açıyla ve çizgi ekim tarzında ekilir. Deney kültürü ile *Staph. aureus* ve *Rho. equi* kültürleri birbirine temas etmemeli, ancak 1-2 mm ayrı olacak şekilde çok yakın olmalıdır. Türü belirlenecek birkaç *Listeria* izolatı, aynı Petri kutusuna ekilebilir. Kontrol amacıyla aynı zamanda *L. monocytogenes* (*Staph. aureus* ile pozitif reaksiyon, *Rho. equi* ile negatif sonuç); *L. ivanovii* (*Rho. equi* ile pozitif sonuç, *Staph. aureus* ile negatif sonuç) ve *L. innocua* (*Rho. equi* ve *Staph. aureus* ile negatif sonuç) kontrol kültürleri de çizgi ekim tarzında ekilir. Ekimi yapılan Petri kutuları 35-37 °C'ta 18-24 saat inkübe edilir.

Staph. aureus ya da *Rho. equi* kültürleri ile deney kültürlerinin kesiştiği noktada β-hemoliz zonunun artması pozitif reaksiyon olarak kabul edilir. *Staph. aureus* veya *Rho. equi* ile kuvvetlenen hemoliz ok başı, raket ya da şişe şeklinde tanımlanmaktadır. *Rho. equi* ile *L. ivanovii* hemoliz reaksiyonu oluşturur, *L. monocytogenes* ve *L. seelegeri* ise *Staph. aureus* ile kesiştiği alanda geniş

[11] Bazı bilimsel kitaplarda CAMP açılımı olarak Christie - Atkins - Munch - Peterson şeklinde dört isim verilir. Oysa doğrusu, **C**hristie, **A**tkins ve **M**unch-**P**eterson şeklinde üç isimdir.

hemoliz reaksiyonu oluşturur (bknz. Şekil 06.05). *L. innocua*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*, hemoliz negatiftir.



Şekil 06.05. *Listeria* türlerinde hemoliz reaksiyonları (CAMP testi)

06.04.03.24. Hemoliz Testi

Kandaki hemoglobin, bakterilerdeki farklı hemolizin enzimleri ile farklı şekillerde parçalanır. Bu enzimlerin varlığı standart olarak kanlı agar besiyerinde belirlenir. Buna göre, α, β ve γ olmak üzere üç tip hemoliz vardır. α-hemolizde koloni etrafında tam bir parçalanma yoktur. Kan kısmen parçalanmıştır ve zonun 1/3 kadarı yeşil bir renk alır. Zon, tam belirgin değildir. β-hemolizde hemoglobinin tam parçalanmasına bağlı olarak belirgin saydam bir zon oluşur. γ-hemoliz olarak tanımlanan sonuç ise hemoliz olmadığını belirtir. Koloni etrafında zon meydana gelmez.

Testin uygulanışında hemoliz reaksiyonu belirlenmek istenen ~18 saatlik aktif ve saf kültür, koyun kanlı agar besiyerine öze ile sürülür. İnkübasyon sonrası Petri kutusunda hemoliz reaksiyonu incelenir. İnkübasyon sıcaklık ve süresi, test edilen bakteriye göre değişir.

06.04.03.25. Litmuslu Süt Testleri

Süt ortamında bakterilerin metabolik reaksiyonlara dayalı ayrımını sağlayan testtir. Litmus, pH indikatörüdür ve asit pH'da (pH 4,5) kırmızı, alkali koşullarda pH 8,3'te mavi renk oluşur. Litmuslu süt besiyerinin orijinal pH'sı 6,8'de açık morumsu mavi renktedir. Bakteri inokülasyonu ve inkübasyon sonrası laktoz fermente edildiğinde oluşan laktik asit (nadiren bütirik asit) nedeniyle besiyeri rengi pembe kırmızıya dönüşür. Litmuslu sütte laktozu fermente edemeyen bakteriler alkali reaksiyon oluşturarak besiyeri rengini morumsu maviye dönüştürürler.

Laktozun fermantasyonu sırasında bazı mikroorganizmalar yoğun CO_2 ve H_2 gazı oluşturabilir. Sonuçta besiyerinde gözle görülebilen yoğun çatlaklar ya da gaz yarıkları oluşur ve bu durum gazlı (fırtınalı; stormy) fermantasyon olarak da

adlandırılır. Bu reaksiyonlar, C*l. perfringens* ve *Cl. butyricum* gibi *Clostridium* türlerinin tanımlanmasında önemli özelliklerdir.

Litmus, aynı zamanda oksidasyon redüksiyon indikatörüdür. Bazı bakterilerin gelişmesi sonucunda tüpün dip kısmında oksijen azalmasına bağlı olarak indirgenen litmus, beyaz renk oluşur. Proteolitik enzimler sütü hidrolize ederek sütün pıhtılaşmasına neden olur.

Kullanılan besiyeri bileşimi, yağsız süt tozu 100,0 g; litmus 5,0 g ve saf su 1000 mL şeklindedir. Bileşenler suda çözünür, 16x160 mm standart boyutlardaki test tüplerine dağıtılır, 115 ºC'ta 10 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası pH 6,8±0,2'dir. Sıcakken rengi beyazdır, oksijeni absorbe etmeye başlayınca açık morumsu mavi renge dönüşmeye başlar.

Testin uygulanışında ~18 saatlik aktif ve saf kültür ile aşılanan litmuslu süt, 35-37 ºC'ta 18-24 saat inkübe edilir. İnkübasyon, 14 güne kadar uzatılabilir ve belirli aralıklarda reaksiyon kontrol edilir. Anaerobik mikroorganizmalar için besiyeri mineral yağ ile kapatılır. Kırmızı renk oluşumu laktozun kullanılarak asit oluştuğunu, mavi renk alkali reaksiyonu ve gaz oluşumu ise gazlı fermantasyonu gösterir.

06.05. Yıkama

Günlük (rutin) mikrobiyolojik gıda analizi amacıyla laboratuvara getirilen Türk tipi standart hıyar turşusu, bal vb. birkaç gıda maddesinde hastalığa yol açabilecek sayıda patojen bakteri olması genel olarak beklenmez. Her ne kadar balda *Cl. botulinum* sporları olması muhtemel ise de günlük mikrobiyolojik analizlerde bu sporların ergin insanların bağırsağına erişmesi, burada çimlenip toksin oluşturması tümüyle ihmal edilecek bir risktir.

Buna göre geleneksel hıyar turşusu ve bal gibi gıdalarda mikrobiyolojik analiz yapılırken 30-40 dk gibi çok kısa bir süre içinde "kullanılan ilk seyreltme (homojenizasyon) ve diğer seyreltmelerde kullanılan cam malzeme ve pipetler, ekimden hemen sonra, doğrudan yıkanabilir" şeklinde bir görüş ortaya çıkabilir ve çok genel bir yaklaşımla bu uygulama benimsenebilir.

Ancak "genel laboratuvar güvenliği" kuralları çerçevesinde hiçbir tavize ve toleransa izin verilmez. Bunun gerekçesi basit olarak şu şekilde açıklanabilir: Laboratuvar güvenliğinden taviz verilmeye başlanırsa farklı laboratuvarlarda bu taviz/ tolerans, farklı boyutlara taşınabilir.

Bu konu basitçe siyah ya da beyazdır, gri yoktur. Pazarlık yoktur, olmamalıdır.

Buna göre laboratuvarda mikrobiyolojik analize alınan tüm gıdalar gıdanın ne olduğu, mikrobiyolojik analizin ne kadar sürede tamamlandığı vb. tüm yorumlardan uzak bir şekilde laboratuvar personeline ve çevreye zarar verebilecek potansiyel tehlikeli materyal olarak değerlendirilir. Kuşkusuz bu

değerlendirme, klinik ve çevre laboratuvarları dâhil olmak üzere tüm mikrobiyoloji laboratuvarları için de geçerlidir.

Devamında yüzeylerden, çalışanların ellerinden vb. yerlerden alınan tüm svap numuneler dâhil tüm materyal sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.

Daha da ötesinde gözle görülür bir mikrobiyolojik gelişme görülmeyen ve hatta yoğurt bakterileri gibi aslında yararlı bakterilerin geliştiği tüm besiyerleri dâhil olmak üzere mikrobiyel gelişme olmuş tüm besiyerleri sterilize edildikten sonra yıkanmalı/ atılmalıdır.

-Bir Petri kutusunda gözle görülebilir koloni oluşmamış olması, henüz gözle görülemeyecek kadar küçük bir patojen bakteri kolonisi olmadığını garanti etmez. Henüz gözle görülemeyecek kadar küçük bir patojen bakteri kolonisi milyonlarca sayıda bakteri içerebilir. Gereken önlem alınmalı, konu üzerinde aşırı kuşkucu ve dikkatli olunmalıdır.

-Yoğurt bakterilerine patojen bakteri bulaşmamış olduğunu hiç kimse garanti edemez ve buna bağlı olarak hiç kimse gereksiz yere risk almamalıdır. Ayrıca patojenle bulaşmış olmadığı garanti edilse bile bu kültürü sterilize etmeden lavaboya dökmenin asıl sakıncası, laboratuvar güvenliği uygulamalarından taviz vermektir.

Günlük uygulamada, Türk tip hıyar turşusu örneğinde olduğu gibi homojenizasyonda kullanılan malzemelerin tümünün sterilize edilmeden doğrudan yıkandığı bilinmektedir. Analizde kullanılan tüm malzemenin sterilize edildikten sonra yıkanması/ atılması sadece bir öneridir.

Yıkama öncesi sterilizasyon, mikrobiyolojik analizlerde en önemli hususlardan birisidir. Bu aşamada uygulanan otoklavlama işlemi, standart besiyeri sterilizasyonundan daha yüksektir. Sıcaklık yine 121 ^{o}C iken süre 30 dk olarak uygulanır. Bunun nedeni analiz sonrasında kullanılmış materyalde çok yoğun sayıda mikroorganizma olmasıdır.

Otoklav normundaki yükseklik ve daha önemli olarak laboratuvar kuralları çerçevesinde yıkama öncesi sterilize edilecek malzeme ile yeni hazırlanan besiyerlerinin sterilizasyonu, aynı otoklavlama işleminde yapılmaz. İdeal olarak bu amaçla iki ayrı otoklav kullanılmalıdır.

Ancak burada dikkate alınması gereken konu, otoklav eskidiği için yeni bir otoklav alındığında eski otoklavın yıkama öncesi sterilizasyon için ayrılmasıdır. Eski otoklavın bu amaçla kullanıldığı uygulamanın yıkamadan sorumlu personelin sağlığını ciddi bir şekilde riske sokacağı unutulmamalıdır.

Biyokimyasal test uygulanmış tüplerin yıkama öncesi otoklavlanması, kimyasal buharları açısından mümkün olmayabilir. Örneğin, indol testi uygulamasından sonra amil alkol ve HCl buharları, sağlığa ve otoklava zarar verir. Bu gibi durumlarda kimyasal maddeler ile dezenfeksiyon da uygulanabilir. Dezenfektan seçimi ve başta süre olmak üzere uygulama koşulları, kimyasal madde

dezenfeksiyonunda dikkate alınmalıdır. İndol testinde kullanılan Kovacs' ayıracının içindeki amil alkol ve HCl, zaten dezenfektan gibi davranıp mevcut mikroorganizmaları öldürür. Bu testin yapılışından sonra tüplerin oda sıcaklığında bir gece beklemesi yeterlidir. Analiz, *Enterobacteriaceae* üyeleri gibi ısıl işleme dayanıksız türler ile yapıldıysa tüpler, çeker ocak altında basitçe 30 dk kaynatılarak pastörize edilir ve sonra yıkanabilir.

Sadece hazır membran filtrasyon besiyerleri kullanan bazı içme ve kullanma suyu analiz eden mikrobiyoloji laboratuvarlarının bazılarında otoklav yoktur. Bu gibi laboratuvarlarda ekimi yapılmış tüm besiyerleri, koloni gelişmesi olmuş ya da olmamış olsa dahi kimyasal maddelerle sterilize edilerek atılır. Bu amaçla ticari dezenfektanlar kullanılıyorsa üretici firmanın talimatlarına uyulmalıdır.

Ev tipi çamaşır suyu da etkin bir kimyasal dezenfeksiyon için kullanılabilir. Ticari olarak pazarlanan çamaşır sularında sodyum hipoklorit derişimi genellikle %5 (50.000 ppm)'dir. Çamaşır suyu kullanılarak 500 ppm (1:100 seyrelti) olarak hazırlanan çözelti içinde kullanılmış tüm malzeme tam ıslanacak şekilde bir gece bekletildiğinde sporlu bakteriler dâhil olmak üzere gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren tüm mikroorganizmalar yok edilmiş olur.

Yıkamadan sonra iyi bir durulama son derece önemlidir. Son durulama, mutlaka saf su ile yapılmalıdır. Cam malzemede kalabilecek deterjan kalıntıları mikroorganizma gelişmesini engelleyebilir. Pipetler henüz ıslak iken üzerlerine %0,04 bromtimol mavisi (bromothymol blue) damlatılarak test edilir. Eğer renk koyu yeşilden açık maviye dönüşmez ise deterjan kalmış demektir, tekrar çalkalanıp test edilmesi gerekir.

Plastik (tek kullanımlık; disposal) malzeme, özel otoklav poşetleri içinde sterilize edildikten sonra atılır.

Cam malzemelerde kalan çözünmesi zor kalıntıları temizlemek için gerekirse yıkama çözeltisi hazırlanabilir. Bu amaçla 5 mL saf su içinde 5 g $K_2Cr_2O_7$ çözülür, üzerine yavaşça 100 mL teknik sülfürik asit katılır. Sıcaklık bu sırada 70-80 °C'a ulaşır. Karışım, oda sıcaklığına soğuduğunda cam kapaklı bir şişeye alınarak saklanır. Bu çözelti ilk hazırlandığında turuncu renktedir. Rengi yeşile döndüğünde artık kullanılamaz, yenisi hazırlanır.

06.06. Laboratuvarda Otokontrol

Mikrobiyolojik analizler, fiziksel ve kimyasal analizlerden farklıdır. Fiziksel ve kimyasal analizlerde aynı numunede aynı operatör tarafından aynı zamanda yapılan analizlerde farklı sonuçlar alınırsa bu, rahatsızlık vericidir.

Tersine olarak, mikrobiyolojik analizlerde ise aynı numunede aynı operatör tarafından aynı zamanda yapılan analizlerde çok yakın sonuçlar alınırsa bu rahatsızlık vericidir.

Analizde tekrar edilebilirlik (aynı örnekte, aynı operatör tarafından aynı zamanda yapılan analizde) farklı disiplinlerde farklı değerlendirilir. Bu farklı değerlendirmeler uluslararası kabul görmüş standartlarda, kodekslerde, komitelerde vb. bilimsel esaslı örgütlerde sadece bilimsel sonuçlara dayanarak bu şekilde kabul edilmiştir.

Mikrobiyolojik analizlerde çok kabaca olmak üzere aynı numuneden aynı operatör tarafından aynı zamanda ve iki bağımsız tekerrür (numunenin tartımdan başlayarak homojenize edilmesi ve devamında kullanılan seyreltme çözeltileri ve besiyerlerinin dahi yeniden hazırlandığı, otoklavlandığı, özetle, tümüyle farklı analiz) şeklinde yapılan bu analizlerin sonuçları arasında %10 fark mükemmel bir sonuçtur. Söz konusu iki analiz arasındaki sayım sonucu farkı %20'ye kadar kabul edilebilir.

Süt tozu, ışınlanmamış kuru baharat vb. gibi mikrobiyolojik olarak stabil olan/ stabil olduğu kabul edilen aynı gıda numunesinden farklı zamanlarda yapılan mikrobiyolojik analizlerde, Petri kutusundaki koloni sayım sonuçlarının logaritmaları alınır, ortalamanın standart sapması 0,10-0,15 arasında olmalıdır. Daha yüksek standart sapmalarda düzeltici uygulama yapılır. Daha düşük standart sapmalarda ise operatör izlemeye alınır. Mikrobiyolojik analizlerde sayım sonuçlarının birbirine çok yakın çıkması şüphe uyandırır.

Fiziksel ve kimyasal analizlerde bu değerler ve yaklaşımlar çok farklıdır.

Mikrobiyolojik analizlerde beklenmeyen bir sonuç alındığında yapılabilecek fazla bir şey yoktur. Asıl önemli olan laboratuvarda hataların en aza indirildiğinden emin olunması ve operatörün/ laboratuvar sorumlusunun beklenmedik/ alışılagelmedik bir sonuç ile karşılaştığında bunun farkına varması ve tüm analizi sorgulamasıdır.

Beklenmedik/ alışılagelmedik bir sonuç, analiz yapılan numunede beklenmedik/ alışılagelmedik bir bulaşma anlamına gelebileceği gibi laboratuvarda çok basit bir hata kaynaklı da olabilir. Her koşulda acil eylem planı uygulanmalıdır.

Laboratuvar sayım sonuçlarında örneğin, reçelde hatalı olarak toplam maya sayısının on kat eksik ya da fazla sonuç alınmış olması çok genel olarak halk sağlığını fazlaca ilgilendirmez, çünkü bugüne kadar sindirim yolu ile vücuda giren maya türleri içinde patojen bir mayaya rastlanmamıştır[12]. Benzer şekilde, analizi yapılan numunede gerçekte var olmayan bir patojenin laboratuvar analizinde [var] olarak değerlendirilmesi de halk sağlığını ilgilendirmez, sadece işletme açısından ekonomik kayıplara neden olur.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında yapılabilecek en ciddi hata, son üründe patojen [var] iken sonucun [yok] olarak elde edilmesi ve bu şekilde

[12] Biyolojide kesinlik yoktur. Örneğin bugüne kadar sindirim yolu ile vücuda giren maya türleri içinde patojen bir mayaya rastlanmamış olması bundan sonra da rastlanmayacağı anlamına gelmez.

raporlanmasıdır. Böylesi bir yanlış (sahte; false) negatif sonuç halk sağlığını ciddi şekilde ilgilendirir.

Her gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı, önceden belirlenmiş belirli aralıklarla laboratuvarda otokontrol yapmalıdır. Bu süre tercihen en geç 2-3 ayda bir, ancak laboratuvara yeni katılan operatör için oryantasyon (laboratuvara uyum) aşamasından sonra tercihen en geç 1-2 hafta sonra olarak planlanmalıdır.

Laboratuvarın otokontrolü ve devamında akreditasyonu, gıdanın basit olarak analiz edilen mikroorganizma ile kontrollü koşullarda kontamine edilmesi (bulaştırılması) ve devamında gıda analizinde kontaminant (bulaş) varlığının var/ yok sonucu ya da sayısal değerlerle ifadesinin kontrolünü/ doğrulanmasını gerektirir. Analiz edilen mikroorganizma, kültür koleksiyonundan sağlanabilir

Bu kontrol/ doğrulama ise şahit kültür ile çalışmakla sağlanır. Şahit kültürler, önceden laboratuvar kalite sisteminde belirtilmiş olmak kaydı ile birkaç ayda bir kez analiz edilen numuneye ilave edilerek beklenen pozitif ve negatif sonuçların alındığı görülmelidir. Bir diğer deyiş ile analiz laboratuvarı, belirli aralıklarla otokontrol yapmalıdır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında bu amaçla özellikle istenmeyen patojenleri de içeren basit bir kültür koleksiyonu bulunmalıdır.

Benzer otokontrol uygulaması, sayım için de yapılmalıdır. Bu konuda basit bir uygulama örneği şöyle verilebilir:

-CASO broth gibi genel bir sıvı besiyerine birkaç öze aşılanan koliform bakterilerin 1 gece inkübasyonu sonunda çok yaklaşık olarak 10^9 KOB/mL bakteri içeren kültürü elde edilir. Bu kültürün standart şekilde yapılan 10^{-4} seyreltisinde ~10^5 KOB/mL koliform vardır.

-Gıda numunesinden 10 g(mL) alınıp 90 mL uygun homojenizasyon çözeltisinde homojenize edilir.

-Koliform bakterinin 10^{-4} seyreltisinden 1 mL alınıp 100 mL olan homojenizata eklenir ve iyice karıştırılır. Artık homojenizatta ~10^3 KOB/mL koliform vardır.

-Buradan 0,1 mL alınıp VRB Agar besiyerine standart yöntemle yayma kültürel ekim yapılır. 37 ºC'ta 24 saat inkübasyon sonunda Petri kutusunda ~100 koloni oluşması beklenir.

-Bu çalışmada bir gece aktifleştirilmiş kültürdeki koliform sayısı ~10^9 KOB/mL olarak kabul edilmiştir, ancak bakteri bu sayıya tam olarak erişememiş olabilir. Ekim ve inkübasyon sonunda VRB agar Petri kutusunda 60-85 adet koloni oluşması daha gerçekçidir.

Bu gibi otokontrol amaçlı sayım testleri de işletmenin standart otokontrol programında yer almalıdır.

Biyokimyasal (ve yapılıyor 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 1 dk içinde tüpün üstünde vişneçürüğü renkte 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, *Ent. aerogenes* negatif şahit olarak kullanılabilir.

Sadece testler değil, kullanılan besiyerlerinin verimi de (performansı) aynı şekilde kontrol edilmelidir. Genel ya da selektif bir besiyeri kutusu tümüyle kullanılıp yerine yenisi açılmadan hemen önce eski ve yeni kutuların aynı şahit mikroorganizma kültürleri ile beraberce ekilmesi ve sonuçların kontrol edilmesi gerektiği kimi zaman 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 birkaç 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 kontrolüdür. Hazırlanan her besiyerinden en az 2 adet fazla hazırlanmalıdır. Bunlardan en az biri, ekim yapılmadan inkübatöre konulmalı ve böylece besiyerinin steril olup olmadığı denetlenmelidir. FDA kurallarına göre en az bir Petri kutusu (özelikle toplam bakteri ile maya-küf sayımlarında) çalışma süresince ağzı açık olarak tutulmalı, çalışma sonunda Petri kutusu kapağı kapatılmalı, bu süre kaydedilmeli ve bu Petri kutusu çalışma atmosferinin kontrolü için inkübatöre konulmalıdır. Analiz edilen numuneden yapılan ekimler sırasında Petri kutularının kapakları analiz süresince tümüyle açık bırakılmadığı için atmosfer kontrolü yapılan bu Petri kutularında en fazla 1 koloni/ dk bakteri ve/veya küf kolonisine izin verilebilir.

Devamında Drigalski spatülünün dezenfekte edildiği alkolün kontrolü için alkolde tutulan spatülün alevden geçirilmeden kullanımda olan ilave bir besiyerine aktarılması, diğer bir besiyerine seyreltmede kullanılan ve steril olması gereken seyreltme çözeltisinden 0,1 mL aktarılarak bunun da sterilliğinin kontrol edilmesi daha sık olarak yapılması gereken kontroller arasındadır. Alkol kontrolü ve seyreltme çözeltisi sterilite testinin PCA, CASO agar gibi genel besiyerlerinde yapılması önerilir.

Gerek günlük analizlerde gerek otokontrol amaçlı var/ yok analizlerinde en önemli faktörlerden birisi de refakatçi flora baskılamasıdır. Basit bir örnekle, *Salmonella* spp. analizinde homojenizata[13] ~18 saatlik aktif *Salmonella* spp.

[13] *Salmonella* vb. patojen analizleri, analiz edilecek gıdanın 25 g(mL) + 225 mL zenginleştirme besiyerine aşılanması ile başlar. Analiz edilecek gıda sıvı ise zenginleştirme çözeltisine eklenen 25 mL gıda basit olarak elle karıştırılarak bile homojenize edilebilir. Gıda katı ise 25 g tartılıp 225 mL zenginleştirme besiyerinde blender/ stomacher vb. uygulamalar ile homojenize edilir. Burada kastedilen bulaştırmanın (kontaminasyonun) her koşulda homojenizata yapılmasıdır.

kültüründen 10 µL ve ~18 saatlik aktif *E. coli* kültüründen 10 mL bulaştırılırsa basit olarak homojenizatta *Salmonella* spp./ *E. coli* oranı çok yaklaşık 1/1000 olur ve standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı, standart *Salmonella* analizinde bu yoğunlukta refakatçi flora olarak *E. coli* bulunması koşulunda *Salmonella* spp.'yi var olarak belirleyebilmelidir. Laboratuvar akreditasyon çalışmalarında, söz konusu *Salmonella* spp./ *E. coli* oranı genellikle $1/10^6$ olarak çalışılmaktadır.

Laboratuvar analizinde pozitif şahit ile bulaştırılmış gıdada aranan bakteri sonucu pozitif olarak alınamıyor ise analiz edilen asıl gıdadaki negatif sonucun geçerliği yoktur.

Bu konu üzerinde "13. Mikrobiyolojik Analizlerde Metotların Geçerli Kılınması ve Doğrulanması" bölümünde ayrıntılı bilgi verilmiştir.

06.07. Kültür Koleksiyonu

Her laboratuvarda günlük analizlerde kullanılan bakterilerin düzenli bir kültür koleksiyonu bulunmalı, bu koleksiyon günlük analizlerde pozitif ve negatif şahit olarak kullanılmak üzere korunmalıdır. Yukarıda 06.04. Morfolojik, Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler bölümünde testler için pozitif ve negatif şahit bakteri örnekleri verilmiştir.

Örneğin bir gıda işletmesi laboratuvarında *E. coli* analizi sıkça yapılıyorsa bu laboratuvarın kültür koleksiyonunda *E. coli* bulunmalıdır.

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

Her ne kadar kültür koleksiyonu konusunda başta liyofilizasyon (dondurarak kurutma) ve sıvı azotta (-196 ^oC) dondurma olmak üzere çok farklı yöntemler bulunmakta ise de standart analiz yapan bir gıda laboratuvarı için kültür koleksiyonu, daha basit kültür koruma yöntemleri ile düzenlenebilir.

Aşağıda küçük bir kültür koleksiyonu oluşturmak için basit yöntemler açıklanmaktadır:

-CASO broth gibi sıvı bir besiyerinde, birkaç haftada bir yapılan pasajlarla[14] kültürün canlılığı ve aktivitesi korunsa da bu yöntem önerilmez. Çünkü zaman içinde genetik deformasyon olabilir. Amaç, koleksiyondaki kültürün en az sayıda aktifleştirilmesidir. Her aktifleştirmede kültürün kendi özelliklerini yitirme şansı giderek artar.

[14] Pasaj, mikrobiyolojik anlamda bir kültürün aktifleştirilmesidir. Pasaj yapılacak mikroorganizma uygun bir sıvı besiyerine birkaç öze aktarılır ve uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir.

-Kısa süreli (en çok 1 ay) depolamalarda, sıvı besiyerinde ve standart buzdolabında koruma mümkündür, ancak bu şekilde yapılan koleksiyonda korunacak mikroorganizmalarda cins ve türün önemli olduğu unutulmamalıdır. Çok genel olarak *Enterobacteriaceae* üyeleri, *Listeria* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. ve *Staph. aureus* bu şekilde sıvı besiyerinde ve buzdolabı sıcaklığında 1 ay süre ile korunabilir.

-Genel olarak yatık CASO agar besiyerine daldırma ve yüzeye sürme yöntemi, gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren pek çok bakteri için geçerli ve basit bir yöntemdir.

-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. İnkübasyon öncesinde, tüplerin üzerinde gerekli bilgiler (bakteri adı, koleksiyona alındığı tarih, kullanılan besiyeri vb.) yazılmış olmalıdır. İnoküle edilen tüpler uygun sıcaklıkta 18-24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda tüpler, standart buzdolabı sıcaklığında korumaya alınır. Tüplerde kurumanın önlenmesi için parafilm ile sarılması gereklidir. Bu amaçla mutfak tipi strech film de başarılı ve tatmin edici şekilde kullanılmaktadır. Daha işlevsel olmak üzere bu besiyeri, vida kapaklı tüplerde hazırlanır.

-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* spp. için anaerop ortam gerektiği gibi ayrıntılar göz ardı edilmemelidir.

-Örnek alınması gerektiğinde koleksiyondaki tüpten bir öze kültür alınıp CASO broth ve nutrient broth gibi uygun bir sıvı besiyerine aktarılır ve uygun sıcaklıkta 18-24 saat inkübe edilir. Uygun sıvı besiyeri amaca göre CASO broth, MRS broth, M17 broth, hatta %10 yağsız süt (skim milk) olabilir.

-Tüplerden birisi örnek almak 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.

-Kapakları açık olarak otoklavda (121 ^{o}C'ta 15 dk) sterilize edilmiş Eppendorf tüplerine ~18 saatlik aktif kültür ile otoklavda sterilize edilmiş gliserolden eşit miktarda eklenerek -18 ^{o}C'ta (ya da -80 ^{o}C) koruma sağlanabilir. Bu amaçla steril kriyotüp de (cryotube; donma sıcaklığına dayanıklı tüp) kullanılabilir. Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken en önemli husus Eppendorf tüplerinin ve/ veya kriyotüplerin kapaklarının açılıp kapatılırken kontamine edilmemesine

özen göstermektir. Bu amaçla koleksiyona alınacak kültürden kullanım sıklığına bağlı olarak 5-10 adet hazırlanır ve her seferinde bir tüp kullanılır.

-Özellikle süt endüstrisinde starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri için liyofilizasyon ya da sıvı azotta koruma gereklidir. Laktik asit bakterilerinin korunması için geleneksel bir yöntem şöyledir: %10 skim milk besiyeri hazırlanıp tüplere 10'ar mL olarak dağıtılır, tüplere ~1 g $CaCO_3$ eklenip otoklavda sterilize edilir. Bu besiyerine aşılanan kültürler uygun sıcaklıkta ~18 saat inkübe edildikten sonra buzdolabında ~3 ay süre ile korunabilir. Bu uygulamada, $CaCO_3$ oluşan asitliği nötralize ederek asitliğin kültür üzerindeki olumsuz etkisini giderir.

Kültür koleksiyonu için çeşitli kaynaklarda önerilen bir yöntem, eksik inkübasyondur. Bu amaçla tercihen vida kapaklı tüplerde yatık agar besiyerine koleksiyona alınması istenen kültür sürülür ve ~6-8 saat uygun sıcaklıkta inkübe edilerek buzdolabında korumaya alınır. Aktifleştirme aşamasında bu tüp tekrar uygun sıcaklıkta ~6-8 saat inkübe edilir. Bu şekilde koloni gelişmesi tamamlanır. Bu uygulamada kültürün hiçbir şekilde dondurulmaması gerekir, çünkü logaritmik gelişme aşamasında hücreler donmanın neden olacağı zararlara duyarlıdır. Ayrıca bu uygulamanın tüm mikroorganizma türleri için geçerli olmayacağı açıktır. Çok genel olarak *Enterobacteriaceae* üyeleri, *Listeria* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. ve *Staph. aureus* bu şekilde korunabilir. Bu yöntem, yaygın olarak kullanılmaz.

Gıda işletmelerindeki kültür koleksiyonunda patojen bakterinin laboratuvardaki 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. Konu üzerinde yeterince deneyimli teknik personeli olmayan gıda işletmelerinde, *E. coli* O157:H7 serotipi ve diğer primer patojenler koleksiyona alınmamalıdır. Gerekirse personelin konu üzerindeki eğitimi ve rutin geri alma kontrolleri bu analizleri günlük olarak yapan kamu laboratuvarları (üniversiteler, kamu kontrol laboratuvarları) ya da akredite olmuş özel sektör laboratuvarlarında yapılmalıdır. Pek çok gıda işletme laboratuvarı, patojen olmayan bir serotip de olsa hiçbir *Salmonella* ya da diğer herhangi bir patojeni işletme laboratuvarında bulundurmak istemez.

ISO 11133 sayılı standartta kültür koleksiyonu için üç 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 tüplerin üzerinde tam olarak belirtilmelidir.

-Çalışma kültürü: Referans stoktan elde edilen sıvı besiyeri kültürüdür. Liyofilize ya da derin dondurulmuş referans stoklardan hazırlanmalıdır. Bu kültürler 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.

06.08. Stok Takibi ve Analiz Ekonomisi

Tüm laboratuvar analizlerinde olduğu gibi gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında da analiz maliyetleri önemlidir. Toplam analiz giderini azaltmak için analiz sayısında azaltma yapmak, fiyatı düşük malzeme kullanmak vb. gibi gereksiz ve kimi zaman çok daha pahalıya gelebilecek önlemlerden kaçınılmalıdır. Fiyatın düşük olması ucuz anlamında değildir. Fiyat/ kalite ilişkisi önemlidir. Düşük fiyatla alınan malzeme, yeterli kalitede değilse sonucun çok pahalıya gelebileceği gözden uzak tutulmamalıdır.

Aşağıda laboratuvar analiz maliyetini azaltmak için basit bazı örnekler verilmiştir:

-Ekimlerde gereksiz yüksek ya da düşük seyreltmelerden kaçınılması gerekir.

-Aynı mikroorganizmanın (örneğin *E. coli*) analizi için ticari firmalar farklı besiyerleri üretmektedirler. Kuşkusuz, başta ISO olmak üzere uluslararası çoğu standartta kullanılacak besiyeri adı ve bileşimi açıkça belirtilmiştir. Bununla beraber *Salmonella* analizine yönelik ISO 6579-1:2017 numaralı standartta görüldüğü gibi selektif zenginleştirme sonrası kullanılacak iki selektif besiyerinden birisini XLD agar olarak tanımlanmış, diğeri kullanıcının tercihine bırakılmıştır. Buna benzer uygulamalar başka mikroorganizmaların (örneğin *Listeria monocytogenes*) analizinde de vardır. Bu durumda laboratuvar ikinci besiyerini seçmekte özgürdür. Bu gibi seçimlerde besiyeri kutusu fiyatı önemlidir, ancak asıl önemli olan

o kutudan kaç litre besiyeri elde edildiği ve dolayısıyla kaç analiz yapıldığıdır. Besiyeri fiyat kıyaslaması doğrudan 1 litre besiyerinin maliyeti üzerinden yapılmalıdır. Aynı durum farklı markalardaki besiyeri katkıları için de geçerlidir.

-Besiyeri katkıları çoğu zaman belirli bir hacimdeki bazal besiyerine ilave edilmek üzere hazırlanmıştır. Bu katkılar oldukça ekonomik bir şekilde kullanılabilir. Örneğin, *Listeria* analizinde kullanılan Fraser Broth besiyeri 1/2 ve 1/1 konsantrasyonda kullanılır. 4 numunenin beraberce analizi yapılması halinde, 1 şişecik selektif katkı tümüyle kullanılır.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında kullanılan çoğu besiyeri, siparişten kısa bir süre sonra sağlanabilmekle beraber laboratuvar stoklarının düzenli olarak laboratuvar kayıtlarında tutulması zorunludur.

Stok takibinde, besiyerinin hazırlanma şekli ve günlük kullanım miktarı dikkate alınır. Aşağıda bu konuda çeşitli örnekler verilmiştir.

-Örnek 1: Haftada bir kez olmak üzere iki farklı üründen ve sadece 10^{-1} seyreltiden plate count agar (PCA) besiyerine 2 paralel ekim yapılmaktadır. PCA besiyeri, 22,5 g/L derişimde hazırlandığına göre 1 kutu besiyeri ile 1777 adet 12,5 mL besiyeri içeren Petri kutusu hazırlanır. Haftada 4 Petri kutusu kullanıldığına göre, 500 g olan 1 kutu besiyeri 444 hafta (yaklaşık 8,5 yıl) yeterlidir. Laboratuvarda herhangi bir besiyerinin bu kadar uzun süre depolanamayacağı açıktır. Bu örnekte işletmenin besiyerini satın almaması, bunun yerine bir başka laboratuvardan küçük partiler halinde hazır besiyeri sağlaması çok daha ekonomik olacaktır.

-Örnek 2: Kanlı agar besiyeri hazırlanması için kuralına uygun olarak alınmış defibrine kan gereklidir. Bunun sağlanması kolay değildir ve kan alınması uzmanlık gerektirir. Bu nedenle kanlı agar besiyerinin dış laboratuvarlardan satın alınması laboratuvarda hazırlamaktan çok daha kolay ve ucuzdur.

-Örnek 3: Her gün 5 adet 100 mL MRS broth kullanılıyorsa durum yukarıdaki örnekten çok farklıdır. MRS Broth 52,2 g/L derişimde hazırlandığına göre 1 kutu dehidre besiyeri ile 9,57 L MRS broth hazırlanır. Bu durumda 500 g olan 1 kutu MRS broth sadece 19 gün için yeterlidir. Genel olarak 45 gün ithalat süresi de dikkate alınırsa işletme laboratuvarında 3 kutu besiyeri her zaman stokta bulunmalı ve kullanımda olan kutu bittiği anda yenisi sipariş verilmelidir.

Kullanılacak besiyerinin ve analiz yönteminin seçiminde de analiz ekonomisine dikkat edilmelidir. Bunun en tipik örneği koliform grup bakterilerin analizidir.

Örneğin bir su analizinde hedef, sadece 250 mL'de koliform grup bakteri olmaması ise bu kontrol farklı şekillerde yapılabilir:

-250 mL su numunesi, membran filtreden geçirilip filtre uygun bir katı besiyerinde inkübe edilir. Analiz, ISO 9308-1:2014'e göre yapılacak ise kullanılacak besiyeri chromogenic coliform agar (CCA)'dır. İnkübasyon

sonunda filtre üzerinde tipik koliform grup bakteri kolonisi olmamalıdır. Olursa bunun sayısı ve hangi tür(ler)e ait olduğu önemli değildir, analiz bitmiştir.

-0,5 L hacmindeki erlen ya da balon içinde, 250 mL çift kuvvette, örneğin Fluorocult LMX broth hazırlanıp sterilize edilir. Üzerine 250 mL su numunesi eklenir ve 37 ^{o}C'ta 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda besiyerinin rengi yeşile dönerse koliform bakteri olduğu anlaşılır. Bu analizde başlangıç bakteri sayısı bilinemez ve türü önemsizdir.

-250 mL su numunesine 2 adet 100 mL için ve 1 adet 50 mL için olan ReadyCult Coliforms ilave edilir, inkübasyon sonunda renk mavi-yeşil olursa "suda koliform grup bakteri vardır" şeklinde karar verilir.

Yukarıda bahsedilen ilk yöntemde membran filtrasyon seti olmalıdır, bunun sterilizasyonu gerekir. Sterilizasyon alkol ile yapılıyorsa maliyet oluşturur. Ancak burada asıl bağlayıcı olan membran filtrasyon setinin varlığıdır. Diğer maliyetler ihmal edilebilir.

İkinci yöntem (Fluorocult LMX broth), membran filtrasyon sisteminin olmaması halinde analiz maliyeti açısından makul olarak değerlendirilebilir.

İkinci ve üçüncü yöntemlerde kullanılan besiyerlerinde *E. coli* tanımlamaya yönelik MUG katkısı vardır. Eğer analiz sadece koliform grup bakterinin olmaması hedeflenerek yapılıyor ve 1 adet koliform grup bakteri varlığında bile ürün reddediliyor ise MUG katkısı için gereksiz yere ücret ödenmiş olacaktır. Tersine olarak, koliform grup varsa ve bunun *E. coli* olup olmadığının belirlenmesi de işletme için bir değer ifade ediyorsa bu besiyerlerini kullanmak anlamlı olacaktır.

Üçüncü yöntemde besiyeri hazırlama aşaması bile yoktur. Su numunesi üzerine hazır ve ışınlanarak sterilize edilmiş dehidre besiyeri ilave edilir. Bu analizin maliyeti diğerlerine göre daha yüksektir. Ancak mikrobiyoloji laboratuvarı olmayan bir işletme için tek çözümdür. Koliform grup bakteriler, inkübasyon sıcaklığına duyarlı değillerdir ve oda sıcaklığında dahi kolaylıkla gelişebilirler yani inkübatör mutlak gerekli değildir. Analiz tamamlandığında yıkama öncesinde 250 mL numuneye %5 hipoklorit içeren çamaşır suyundan 5 mL eklenirse 1000 ppm hipoklorit elde edilir. Bu derişimdeki hipoklorit, çok güçlü öldürücü bir etkiye sahiptir yani otoklava da gerek yoktur. Bu şekilde bir gece bekletilip ertesi gün doğrudan yıkanabilir.

Özellikle *Staph. aureus* analizlerinde yayma yöntemi ile yapılan sayımda, 14 cm çaplı Petri kutularına 1 mL yayma ya da standart boyda 3 Petri kutusuna 1 mL dağıtma ve yayma, standartlara geçmiş yaygın bir uygulamadır. Standart boy Petri kutularına ~12,5 mL besiyeri dökülürken 14 cm Petri kutusu için bu miktar 50 mL'dir. Konuya sadece besiyeri gideri açısından bakıldığında 3 adet standart Petri kutusu kullanmak çok daha mantıklıdır. Ancak üç Petri kutusunun ayrı ayrı yazılması, bunların tek Petri kutusu gibi değerlendirilmesi

gibi işlemler dikkate alındığında kullanım kolaylığı açısından 14 cm çaplı Petri kutusu çok daha elverişlidir.

Analiz ekonomisinde, yine *Staph. aureus* ile ilgili bir başka örnek, ISO 6888-2:1999 numaralı standartta belirtilen yöntemdir. Buna göre, Baird-Parker agar hazırlanırken bazal besiyerine otoklav sonrası yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu yerine doğrudan yine tellurit içeren tavşan plazması eklenir ve inkübasyon sonunda doğrudan koagülaz pozitif *Staph. aureus* varlığı gösterilir ya da sayılır. Bu şekilde;

-Yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu eklenmiş Baird-Parker agar besiyerinde tipik kolonilere tüpte koagülaz testi uygulanma aşaması atlanmış olur. Böylece tipik kolonilerin brain-heart brothta[15] 18 saat süre ile inkübasyonu ve koagülaz testi için gereken 4 saat ilave inkübasyon süresi olmak üzere toplam 22 saat kazanılmış olur.

-Bu aşamada standart bazal besiyeri fiyatı sabittir, ancak katkı maliyeti dikkate alınmalıdır.

-İşletmenin zaten *Staph. aureus* ile sorunu yoksa yumurta sarısı-tellurit emülsiyonuna kıyasla daha yüksek fiyatlı tavşan plazması kullanması gerekli değildir.

-İşletmede üretilen son üründe ara sıra da olsa koagülaz pozitif *Staph. aureus* çıkıyorsa ve bu işletme için malın sevkıyatında 22 saat önemli ise daha yüksek maliyetli tavşan plazması katkısının kullanması tercih edilebilir. Burada "ara sıra" ve "ilave analiz süresi" işletmenin vereceği karardır.

Bir gıda numunesinde, koliform grup/ *E. coli* analizinde standart olarak kabul edilmiş farklı yöntemler vardır. Bunlardan birisi de Colilert sistemidir (bknz⇒ 08.02.05.03. bölüm). Teknik personel ve/veya laboratuvar olanaklarının nicel ve nitel yetersizliğinde en makul çözümlerden birisidir ve yaygın olarak koliform/ *E. coli* analizinde kullanılır. Analiz maliyeti aynı amaçlı standart analizlere göre oldukça yüksektir. Teknik personel ve/veya laboratuvar olanaklarının nicel ve nitel yetersizliğinin giderilme maliyeti ile bu sistemin kullanılmaya devam edilmesi işletmenin tercihidir.

Buna göre sadece besiyeri gideri değil koşullar ve amaç da dikkate alınarak besiyeri ve yöntem seçimine karar verilmelidir.

[15] Kimi laboratuvarlarda Baird-Parker agarda gelişmiş tipik koloniler, doğrudan tüpte koagülaz testine alınmaktadır. Standart uygulama yukarıda 06.04.03.21. bölümde verildiği şekildedir. Baird-Parker agar kolonileri, doğrudan tüpte koagülaz testine alınır ve kesin pozitif sonuç alınırsa sorun yoktur. Negatif sonuç alınırsa gerçek negatif sonuç mu yoksa sahte negatif sonuç mu olduğu belli değildir.

06.09. 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 sahte negatif sonucun alındığı hatalar, pazara sunulan ürünün istenilen kalitede olmamasına ve dolayısıyla işletmenin kalite politikasına olumsuz etki yaptığı gibi yasal denetlemeler sırasında da sorun yaratmaktadır. Kuşkusuz sahte negatif sonuçta en büyük risk halk sağlıdır. Tersine olarak, aslında istenmeyen bir bakteri için sahte pozitif sonucun alınması işletme giderlerine yol açabilir. Örneğin, üründe gerçekte *Salmonella* olmadığı halde laboratuvar hatası ile *Salmonella* bildirilmesi, ürünün imhasına neden olabilir.

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 yükünün personelin kaldıramayacağı kadar yoğun olması ve/veya laboratuvar alanının yetersizliği, pek çok aksamaya 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 tipik laboratuvar hataları toplu halde gösterilmiştir. Burada belirtilen hataların asla küçümsenmeyecek bir bölümü üniversitelerde, kamu araştırma ve kontrol kuruluşlarında, gıda sanayisinde tarafımızca görülmüş olan hatalardır.

06.09.01. Genel Laboratuvar Hataları

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

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

-Planlama ve inşaat aşamasında, laboratuvar yönü ve/veya camların konumu nedeni ile özellikle sıcak yaz aylarında laboratuvar sıcaklığının (Bunsen beklerinin de etkisi ile) 30 ^{o}C üzerine çıkmasına bağlı olarak 25-28 ^{o}C'ta yapılması gereken inkübasyonlarda sağlıklı sonuç alınamaması. Benzer şekilde inkübatörlerin güneş alan yerlere konulması.

-Cam malzemenin yeteri kadar temizlenmeden ve/veya durulanmadan kullanılması. Yıkama sonrasında iyi bir durulama yapılmaması sonucunda besiyerlerine ve seyreltme çözeltilerine deterjan geçmesi ve sonuçta deterjanın aranacak/ sayılacak mikroorganizma üzerine olumsuz etki yapması. Özellikle cam pipetlerin kirli olarak etüvde sterilize edilmesi sonucunda pipet iç yüzeyinde organik maddelerin yanması ve bu durumun hem pipetteki

hacimlerin rahatlıkla görülmesini engellemesi hem de bu tabaka nedeni ile daha az hacmin pipetlenmesi.

-Yanlış inkübasyon sıcaklığı ve/veya süresi seçimi, anaerop koşullarda yapılması gereken inkübasyonda anaerop koşulun sağlandığının kontrol edilmemesi. Mikroaerofillerin anaerop ortamda inkübe edilmesi. İnkübasyon sırasında anaerop kavanozun kapağının açılarak yeni Petri kutusu ilave edilmesi, ancak yeni bir kimyasal oksijen bağlayıcı poşet konulmaması ve eski poşetin yeterli olacağının sanılması.

-Laboratuvara analize gelen gıda numunesinin analizde kullanılan tüm seyreltme çözeltileri dâhil olmak üzere sterilize edildikten sonra atılması/ yıkanması konusunun ihmal edilmesi[16].

-İnkübatör(ler), pH metre, su banyosu vb. cihazların kalibrasyon eksiklikleri. Saf su cihazının temizlenmemesi, çalışma atmosferinin ve tezgâhların kirli olması.

-Özellikle sıcak yaz günlerinde laboratuvar havasının sıcak olması nedeni ile 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 birkaç steril Petri kutusu, birkaç steril boş tüp, yeterli sayılarda ve boyutlarda steril erlen, steril 9 ve 90 mL seyreltme çözeltisi, yeterli miktar ve hacimlerde pipet olmaması ve "her şeyin planlandığı gibi gitmeyeceğinin bilinmemesi" nedeni ile çalışmanın en küçük bir aksamada tümüyle durması. Bu malzemenin en geç ayda bir olmak üzere yeniden hazırlanmaması.

-Seyreltmede kullanılacak tüplerin tam 9,0 mL olarak hazırlanması gerektiğinin bilinmemesi ve 10 mL olarak hazırlanması ya da EMS yönteminden kalan kötü bir alışkanlık[17] ile tüplere 8-8,5 mL arasında seyreltme çözeltisi konulması. Bazı özel standartlarda ilk seyreltinin 9,9 mL seyreltme çözeltisi + 0,1 mL numune uygulamasının her analizde kullanılacağının sanılması.

---

[16] Çoğu laboratuvarda gıda numunesi bozuk ya da bozuk şüphesi ile değil sadece günlük (rutin) analiz amacı ile laboratuvara gelmişse ve homojenizasyon aşamasından başlamak üzere analiz 30 dk içinde tamamlanmışsa sterilizasyon yapılmadan ve analiz biter bitmez kullanılmış malzeme yıkanmaktadır. Ancak genel prensip, her ne olursa olsun analizde kullanılan tüm materyalin sterilize edildikten sonra yıkanması/ atılmasıdır.

[17] Standart EMS yöntemi uygulamasında tüplerde 10 mL besiyeri olmalıdır. Özellikle patojen analizlerindeki ön zenginleştirme aşamasında 1:9 kuralına bağlı olarak EMS yönteminde tüplere 9 mL besiyeri konulması gereksiz bir laboratuvar gideri tasarrufudur. Kimi laboratuvarlar, tasarrufu abartarak tüplere 8-8,5 mL besiyeri koymaktadırlar.

-Baird-Parker Agar besiyerine MUG ilave edilerek aynı besiyerinde beraberce *E. coli* ve *Staph. aureus* sayılabileceğinin sanılması.

-Saf su cihazından elde edilen saf suyun steril olduğunun sanılması ve bu şekilde kullanılması.

-MUG içermeyen örneğin EMB agardaki metalik yeşil röflenin MUG reaksiyonu ile ilişkilendirilmesi.

-Sıvı besiyerinde katalaz testi yapılması ve bu uygulamada her koşulda negatif sonuç alınacağının bilinmemesi.

-Yüzeylerde hijyen kontrolü amacıyla alınan numunelerden elde edilen RLU (Relative Luminescence Unit) değeri ile aynı yüzeyde yapılan mikrobiyolojik analiz sonucunda elden edilen koloni sayısı arasında bir ilişki olduğu düşünülüp RLU ve KOB değerlerini Excel çizelgeye işleyip buradan istatistiksel grafikler ve formüller elde edilmeye kalkışılması.

06.09.02. Numune Hazırlanması ve Ekim Hataları

-Analize alınacak numunenin uygun olmayan koşullarda uzun bir süre (örneğin pastörize sütün oda sıcaklığında 30 dk) beklemesine bağlı olarak gerçek sayıdan daha fazla sayım sonucu alınması.

-Numunenin yetersiz homojenizasyonu. Anaeroplar aranacak/ sayılacak ise numunenin blenderde uzun süreli homojenizasyonu sırasında numunenin aşırı oksijenle teması sonucu anaeropların zarar görmesi, hatta ölmesi.

-Mayonez gibi yağlı numunelerde özel homojenizasyon ve seyreltme çözeltileri kullanılması gerektiğinin bilinmemesi.

-Petri kutularına yeterli bilgi yazılmaması, bilgilerin taban yerine kapağa yazılması. Eskimiş ve/veya açık renkli cam yazar kalem kullanılmasına bağlı olarak inkübasyon sonrasında Petri kutularındaki bilgilerin okunamaması.

-Yayma ekim yönteminde, Drigalski spatüllerinin sterilizasyonunda kullanılan alkolün eskimesine bağlı olarak konsantrasyonunun azalması ve dolayısı ile kontamine olması. %76 (v/v) yerine daha derişik, hatta saf alkol kullanılması. Drigalski spatülünün alkolde bekletme süresinin en az 2 dk olduğunun bilinmemesi. Drigalski spatülünde kalan 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 5 dk'dan fazla süre geçmesi. Dökme yöntemi ile çalışılırken agarlı besiyerinin çok sıcak dökülmesine bağlı olarak mikroorganizmaların zarar görmesi veya besiyeri katılaşırken dökmeye bağlı olarak Petri kutusundaki numuneyle yeterli şekilde karışmaması. Yeni hazırlanmış agarlı besiyerlerinde yeterli kurutma yapılmadan aşırı nemli ya da aşırı kuru halde iken ekim yapılması.

-Bunsen bekinde tüpün aşırı ısıtılması ve sonrasında tüpe pamuk yerleştirilirken elin yanmasına bağlı olarak tüpün tezgâha/ yere atılması.

-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 alınamaması. Seyreltmede kullanılan tüplere seyreltme oranlarının yazılmaması ve buna 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 Petri kutularına ekim yapılmaması ve/veya bazılarından iki kez ekim yapılması.

-Ekim sırasında cam pipetin üflenmesi. Damlatma yöntemi ile çalışılırken düz olmayan zeminde ekim yapıldığı için damlaların kayması ve/veya damla tam olarak emilmeden Petri kutusunun inkübatöre ters olarak konulması.

-Membran filtrasyonda filtrenin destek tablası steril saf su ile ıslatılmadan destek tablası üzerine konulması. Filtre üzerindeki koruyucu 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 (genellikle filtrasyon bittiğinde destek tablasından pens ile kaldırılırken yırtılması). Ön filtrasyon yapıldığında, ön filtrenin de ayrı bir besiyerine konularak burada da sayım yapılması gerektiğinin ve sonucun iki filtredeki sayımların toplamı olduğunun bilinmemesi. Sıvının filtrasyonu tamamlandıktan sonra, filtre üzerinde kalabilecek koruyucu maddelerin uzaklaştırılması için 80-100 mL kadar steril saf su ya da steril özel yıkama çözeltisi geçirilmemesi veya bunların sterilize edilmeden kullanılması.

-EMS yönteminde 10 mL numune pipetlenecek besiyerlerinin başlangıçta çift kuvvette hazırlanmaması ve/veya bunların 18x180 mm büyük tüp yerine standart 16x160 mm tüplerde hazırlanması. Çift kuvvette hazırlanmış besiyerlerine standart 1 mL ekim yapılması. Durham tüpü bulunan tüplerin mekanik karıştırıcıda karıştırılarak başlangıçta bu tüplere hava girmesi ile sahte "gaz pozitif" olması ve/veya yetersiz otoklavlamaya bağlı olarak otoklav çıkışında bu tüplerin içinde hava kabarcığı kalması. EMS'de seyreltme kavramının ısrarla anlaşılmamasına bağlı olarak orijinal örnekten (10^0 seyrelti) 1 ; 0,1 ve 0,01 mL pipetlenmesi ya da katı numuneden 1 ; 0,1 ve 0,01 g tartılarak tüplere ilave edilmesi. Ekimi yapılan tüplerin seyreltme tüpü olarak değerlendirilip sonraki üç 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 genel laboratuvar disiplinine uymayan ve gereksiz bir uygulamadır).

06.09.03. Besiyerlerinin Hazırlanmasındaki Hatalar

-Yanlış tartım ve/veya sulandırma. Bir kavanoz içinde duran besiyerinin hangi firmaya ait olduğu bilinmediği için başka bir 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.

-Besiyeri hazırlandıktan uzun bir süre sonra sterilize edilmesi. VRB agar gibi otoklavlanmaması gereken besiyerlerinin otoklavlanması ve/veya aşırı ısı girişine yol açacak şekilde yüksek ısıl işlem normu ile otoklavlanması. Aşırı ısı girişinden sakınmak adına VRB agar gibi besiyerlerinde, agar henüz tam erimeden Petri kutusuna dökülmesi ve jelleşme sorunu ile karşılaşılması. Selenite cystine broth gibi otoklavlanmaması gereken besiyerlerinin sıcak su banyosunda yetersiz ısıl işlem ile yetersiz sterilizasyonu.

-Bileşenlerin ve özellikle agarın tam olarak eritilmeden daha küçük kaplara dağıtılarak sterilizasyonu ve sonuçta kimi küçük kaplarda aşırı jelleşme kimilerinde çok zayıf jelleşme.

-Otoklavdan çıkan agarlı besiyerinin 50 ^{o}C'taki su banyosunda 4 saatten fazla tutulması.

-Steril katkıların kontamine edilmesi. Steril katkıların besiyeri 50 ^{o}C üzerinde iken ilave edilmesi. Katkı ilavesinin unutulması ya da dalgınlıkla başka katkı ilave edilmesi ya da katkının gereğinden az veya çok ilave edilmesi. Bazı besiyerlerinde katkının ilave edildiği gün kullanılması gerektiğinin bilinmemesi ve buna bağlı olarak katkı ilave edilmiş besiyerinin depolanması.

-Her liyofilize katkının farklı bir çözelti (su ya da alkol su karışımı) ile çözüleceğinin bilinmemesi. Çözelti ilave edilmiş liyofilize katkının artan kısmının buzdolabında saklanması. Çözelti ilave edilmiş liyofilize katkının artan kısmının bütün olarak derin dondurucuda saklanması ve gerektiğinde eritilip yeteri miktar alındıktan sonra yeniden dondurulması. Katkının buzdolabından çıkarıldığı sıcaklıkta bazal besiyerine ilavesi.

-Agarlı besiyerlerinin steril olmayan Petri kutularına dökülmesi. 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. 121 ^{o}C'ta 15 dk ısıl işlem uygulamasının etüvde (kuru hava sterilizatöründe) yapılması. Hazırlanmış besiyerlerinin laboratuvarda güneş alan tezgâh üzerinde uzun süre bırakılması. Isıl işleme duyarlı ve/veya katkısı eklenmiş agarlı besiyerlerinin tekrar eritilmesi. Agarlı besiyerlerinin depolama amacı ile derin dondurucuda dondurulması.

-Besiyeri yüzeyinin gereğinden fazla nemli ya da kuru olması. Otoklavın bozuk olması nedeni ile besiyerinin aşırı ısıl 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.

-Otoklavlama işleminin yemek saati veya başka analizlerin yoğunluğu nedeni ile otoklavın geç açılması ve dolayısı ile besiyerine aşırı ısı girişi.

-Baird-Parker Agar besiyerine yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu yerine sadece yumurta sarısı emülsiyonu eklenmesi.

-Raf ömrü dolmuş, nem çekmiş dehidre besiyeri kullanılması.

06.09.04. Testlerde Yapılan Hatalar

-HGMF olmadan YM11 Agar besiyerinde 2 günde küf sayımının yapılacağının sanılması.

-Standart LST Broth besiyerinde MUG'lu (örneğin, Fluorocult) LST Broth besiyerinden kalma alışkanlıkla indol testi yapılmaya kalkılması.

-Karbohidrat testlerinde, uzun inkübasyon süresine ve/veya test edilen bakterinin aktivitesine bağlı olarak tüpteki karbohidratın bitmesi ve bakterinin peptonu kullanarak pH'yı yükseltmesi sonucunda sahte negatif sonuç alınması. Biyokimyasal test uygulanmış (örneğin indol testi yapılmış) tüpten izolasyon amacı ile katı besiyerine ekim yapılması.

-Kullanılan çözeltilerin eskimesine, yanlış hazırlanmasına ve/veya kullanılmasına ve/ veya testin yanlış uygulanmasına bağlı olarak sonucun yanlış alınması, test sonucunun yanlış değerlendirilmesi.

-Endo agar besiyerinde metalik parlak yansımanın sadece *E. coli* kolonisine ait olduğunun sanılması. Oksidaz testinin VRB agarda olduğu gibi koyu renkli koloni oluşan besiyerindeki koloni ile yapılması. Oksidaz testinde platin yerine demir ya da nikel öze kullanılması. Oksidaz testi sonucunun 60 sn'den uzun sürede okunması.

06.09.05. Değerlendirme Hataları

-Petri kutusunda yayılmış kolonilerin 1 adet olarak sayılması gerektiğinin bilinmemesi. MUG ilave edilmiş agarlı besiyerlerinde uzun süreli inkübasyon sonrası floresan ışımanın yayılmasına bağlı olarak gerçeğinden daha fazla sayım.

-Ekimi ve sayımı yapan kişilerin farklı olması nedeni ile 2 operatör arasında Petri kutusundaki seyreltme faktörünün farklı şekilde değerlendirilmesi ve genellikle olduğundan 10 kat az ya da 10 kat fazla sonuç verilmesi.

-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 okunması/ değerlendirilmesi.

-EMS analizlerinde kategori kavramının bilinmemesine bağlı olarak 3 0 2 gibi her sonucun doğrudan kullanılması (bknz⇒ 08.02. EMS Yöntemi bölümü).

-MUG ilave edilmiş sıvı besiyerlerinde tüplerin kendiliğinden floresan ışıma verip vermediğinin önceden kontrol edilmemesi ve dolayısıyla sahte pozitif sonuç alınması. Aşırı asit oluşturan bakterilerin MUG reaksiyonunu maskelemesine bağlı olan sahte negatif sonuç alınması. Sadece gaz pozitif tüplerde MUG reaksiyonuna bakılması gerektiğinin bilinmemesi ve gaz olmayan tüplerde de floresan kontrolü ve/veya indol testi yapılması.

-Fluorocult VRB agar ya da Fluorocult LST broth gibi MUG içeren besiyerlerinin değerlendirilmesinde kullanılan sahte para makinesi, mikotoksin analizlerinde kullanılan UV lambalar ya da bu amaçla üretilmiş (örneğin Merck 1.13203) standart lambalar gibi her türlü UV lambaların önceden pozitif ve negatif şahit bakteriler ile loş bir ortamda floresan ışıma açısından kontrol edilmemesi ve floresan ışıma konusunda yeterli deneyim kazanılmaması. Buna bağlı olarak MUG esaslı besiyerleri kullanılarak yapılan *E. coli* analizlerinde sahte negatif ya da sahte pozitif sonuç alınması.

-MUG katkılı örneğin, Fluorocult LST brothta gaz pozitif ve MUG (floresan ışıma) negatif sonucun, *E. coli* olmayan koliform grup bakteri olarak değerlendirilmesi ve *E. coli* O157:H7 serotipinin bu şekilde gözden kaçırılması. Bu gibi MUG esaslı analizlerde MUG negatif sonuç alınırsa *E. coli* O157:H7 serotipinin yakalanabilmesi için mutlaka indol testi yapılması gerektiğinin ve MUG negatif ama indol pozitif sonucun *E. coli* O157:H7 serotipi yakalanmış olma olasılığının bilinmemesi.

-Bir gıda numunesinde, koliform grup bakterilerin EMS yöntemi ile standart analizinde gaz negatif tüplere indol testi yapılması ve bu tüplerden indol pozitif olanların *E. coli* olarak değerlendirilmesi [18].

-*E. coli* suşları/ izolatları içinde %1 gibi düşük olasılıkla olsa da indol negatif olanların bulunacağının bilinmemesi.

-Bazı bakterilerin Gram reaksiyonlarının kültürün yaşına göre değiştiğinin bilinmemesi, bazılarının ise Gram boyama işlemine çok duyarlı oldukları için

[18] Bir gıda numunesinin standart koliform analizinde, LST brothta gelişerek bulanıklık oluşturabilen, ancak laktozdan gaz oluşturamayan koliform grup üyeleri dışında başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere başka bakteriler olabilir. LST brothta Durham tüpünde gaz görülmezse sadece bulanıklık olması dikkate alınmaz. LST brothta gaz oluşturmadan gelişebilenler içinde indol pozitif olanlar da vardır. Fluorocult LST broth gibi MUG ve triptofan içeren besiyerinde, Durham tüpünde gaz görülmeyen tüplere indol testi yapmak büyük hatadır. Sonucun pozitif olması hiçbir şekilde *E. coli* varlığını göstermez çünkü analiz edilen gıda numunesinde *E. coli* olsa idi öncelikle Durham tüplerinde gaz oluşacaktı. Bu aşamada gaz pozitif, MUG negatif, indol pozitif tüplerde *E. coli* O157:H7 serotipi varlığı olasılığına bir kez daha dikkat çekilmektedir.

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 şekilde 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. Mikroskobik inceleme sırasında streptokokların ve stafilokokların monokok ve diplokok şeklinde olan parçaları görüldüğünde incelenen kültürün bulaşık olduğunun sanılması. Mikroskobik inceleme ile tür bazında (örneğin *E. coli* biyotip 1) tanımlanabileceğinin sanılması. Howard yöntemi ile yapılan sayımlarda domates, kayısı vb. hammadde parçalarının küf hifi olarak değerlendirilmesi. Thoma lamında büyük kare sınırlarının anlaşılamaması ve buna bağlı olarak bazı karelerin sayılmaması ya da eksik/ yarım kare olarak sayılması.

-Çoğunlukla koliform grup bakteri analizlerinde geçen 24-48 saat inkübasyon kavramının anlaşılmaması[19] ve buna bağlı olarak örneğin CCA'da inkübasyona 48 saat devam edilmesi.

06.09.06. Eskimiş Standartlar/ Yönetmelikler

Sadece gıda mikrobiyolojisinde değil, çeşitli fiziksel ve kimyasal analizlerde de özellikle uluslararası standartlardaki değişmelere bağlı olarak analiz yöntemleri değişebilmektedir. Gıda mikrobiyolojisinde yeni besiyerlerinin başta ISO olmak üzere uluslararası kuruluşlar tarafından kabul görmesi ve standardın revize edilmesi çok sık görülen bir uygulama değilse de laboratuvarın bu değişiklikleri izlemesi gereklidir. Özellikle ISO belgesine sahip laboratuvarlarda eski

[19] Çoğunlukla koliform grup bakteri analizlerinde geçen 24-48 saat inkübasyon, tam olarak şunu ifade etmektedir: "Besiyerini 24 saat inkübe edin, tipik gelişme olmazsa (yok sonucunu tam olarak kesinleştirmek için) ilave 24 saat daha inkübe edin.". Koliform grup bakteriler içinde geç laktoz pozitif olanlar vardır. Bu uygulama, asıl olarak EMS dâhil olmak üzere seçiciliği/ selektivitesi yüksek olan LST broth, EC broth, VRB agar gibi besiyerlerinin kullanıldığı var/ yok testlerinde uygulanır. Oysa laktoz TTC ve özellikle CCA gibi düşük seçiciliğe sahip besiyerlerinde inkübasyon süresi 24 saat olarak verilmiştir. Seçiciliği yüksek olan LST broth, EC broth, VRB agar gibi besiyerlerinde 24 saat inkübasyon sonunda negatif sonuç alınırsa inkübasyona 24 saat daha devam edilir ve alınan pozitif sonuçlar geçerlidir. Ancak seçiciliği düşük olan laktoz TTC ve CCA gibi besiyerlerinde 24 saat inkübasyon sonunda alınan sonuçlar geçerlidir, 48 saat inkübasyon sonunda alınan pozitif sonuçlar geçersizdir. Kimi analizlerde ise inkübasyon süresi 18-24 saat olarak verilir. Bu ifade, inkübasyon süresinin 18-24 saat aralığında yeterli olduğunu gösterir.

standarda göre analiz yapılmaya devam edilmesi, makul bir süre içinde teknik olarak tolere edilebilir. En azından eski standarda göre satın alınmış besiyerleri tükeninceye kadar bu şekilde devam edilebilir.

Benzer şekilde yasal kuruluşlar tarafından izin verilen limit değerler de zaman içinde değişebilmektedir. Bu limitler, kimi zaman işletmenin daha yüksek kalitede üretim yapmasını gerektirecek şekilde değişebilmektedir. Özellikle bu konuda laboratuvarın çok dikkatli olması zorunludur.

Bu kitaptaki ilgili bölümlerde verilen analiz yöntemleri ve/veya kalite limitleri eskimiş olabilir. Ancak ileriki tarihlerde bunların bir kısmının eskiyeceği açıktır. Bu kitapla ilgili her türlü güncelleme www.mikrobiyoloji.org sitesinden ücretsiz ve şifresiz olarak izlenebilir.

07. GIDALARIN MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ; TEMEL İLKELER

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

07.01. Genel Bilgiler **224**
07.02. Klasik Yöntemler **225**
07.02.01. Var/yok Testleri 225
07.02.01.01. Zenginleştirme/ Canlandırma 226
07.02.01.02. *Salmonella* Örneği 228
07.02.01.03. *Listeria monocytogenes* Örneği 229
07.02.01.04. *E. coli* O157:H7 Örneği 230
07.02.01.05. Diğer Örnekler 231
07.02.02. Sayım 231
07.02.03. Tanımlama 232
07.02.04. Toksin Testleri 233
07.02.05. Biyolojik Stabilite Testleri 233
07.02.06. Hava ve Yüzeylerin Analizi 234
07.02.07. Titre Belirleme 237
07.03. Yeni ve Hızlı Yöntemler **238**
07.04. Numune Alma **241**
07.04.01. Numune Miktarı 241
07.04.02. 2 ve 3 Sınıflı Planlar; n, c, m, M Kavramı 243
07.04.03. Numunenin Alınması ve Laboratuvara Taşınması 246
07.04.03.01. Soğutulmuş ve Dondurulmuş Ürünler 246
07.04.03.02. Soğutulmamış Gıdalar 248
07.04.03.03. Düşük Su Aktivitesine Sahip Gıdalar 248
07.04.03.04. Stabil Gıdalar 249
07.04.03.05. Numunenin Laboratuvara Kabulü 249
07.04.04. Laboratuvar Numunesinin Hazırlanması 250
07.05. Homojenizasyon ve Seyreltme **253**
07.05.01. Homojenizatörler 254
07.05.01.01. Blender 254
07.05.01.02. Stomacher 255
07.05.01.03. Diğer Homojenizatörler 255
07.05.02. Homojenizasyonda Kullanılan Çözeltiler 255
07.05.03. Seyreltme 256
07.06. Ekim ve İnkübasyon **258**
07.06.01. Ekim Yöntemleri 258
07.06.01.01. Yayma Plak Yöntemi 260
07.06.01.02. Dökme Plak Yöntemi 261
07.06.01.03. Damlatma (Damla Kültür) Yöntemi 264
07.06.01.04. EMS Yöntemi 265
07.06.01.05. Membran Filtrasyon Yöntemi 266

07.06.02. Yöntem ve Seyrelti Seçimi 266
07.06.03. İnkübasyonda 24-48 saat kavramı 268
07.07. Sonuçların Verilmesi 268

07.01. Genel Bilgiler

Gıdaların mikrobiyolojik analizi denildiğinde genellikle istenmeyen mikroorganizmaların analizi akla gelir. Oysa kimi analizler özellikle istenen mikroorganizma varlığına yöneliktir. Örneğin, başta yoğurt olmak üzere fermente süt ürünlerinde bulunması gereken canlı mikroorganizma sayısı, ürün kalitesi ve doğrudan halk sağlığı üzerine etkilidir. Bu gibi ürünlerde yararlı laktik asit bakterilerinin sayımı yapılır ve asgari (minimum) sayıda olup olmadığı kontrol edilir.

Gıdalarda istenmeyen mikroorganizma kavramı doğrudan mikroorganizma türü ve gıda çeşidi ile de ilişkilidir. Rokfor peyniri üretiminde kullanılan *Penicillium roquefortii*, yoğurda bulaşır ve burada gelişip küflenmiş bir görüntüye neden olursa bu yoğurt satılamaz. Bunun nedeni halk sağlığı açısından tehlike oluşturması değildir, ancak bu durum işletmenin asgari hijyen kavramını yeterince yerleştiremediğinin açık göstergesidir. Bir başka örnek sirke oluşturan mikroorganizmaların şarap fabrikasına bulaşmasıdır. Bu koşulda şarap, sirkeye dönüşür ve ekonomik kayıp meydana gelir. Bir başka deyiş ile amaç sirke yapmak ise sirke bakterisi yararlıdır, amaç şarap yapmak ise aynı bakteri istenmeyen mikroorganizma olarak tanımlanır. Gıda mikrobiyolojisinde burada verilenler gibi pek çok örnek vardır.

Bu bölümde gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların analizi üzerinde örnekler verilmiştir. Laktik asit bakterileri gibi yararlı bakterilerin analizinde uygulanan yöntemlerin temel mantığı, istenmeyen mikroorganizmaların analizindekilerle aynıdır. Tümünde sırası ile numunenin laboratuvara getirilmesi, numuneden analiz örneği hazırlanması ve homojenizasyon, uygun seyreltilerden hedef mikroorganizmanın gelişebileceği uygun besiyerine ekim, uygun sıcaklıkta ve süre ile uygun gaz atmosferinde inkübasyon, sonuçların değerlendirilmesi, kullanılmış malzemenin sterilizasyonu ve son olarak yıkama/ atma işlemleri vardır. İstenmeyen ve istenen mikroorganizma analizlerinde muhtemelen tek fark patojen analizlerinde kullanılan var/yok testleridir. Gıdalarda bulunması istenen mikroorganizmalar için var/yok testi uygulanmaz, sadece belirli bir sayının altında ya da üstünde olduğunun analizi yapılır.

Gıda güvenliği konusunda yeni yaklaşımlar analiz yöntemlerinde bir seri değişikliği de beraberinde getirmiştir. Buna bağlı olarak laboratuvarlarda otomasyon, kalibrasyon, akreditasyon, yöntemlerin geçerli kılınması (validasyon), standart yöntemlerin doğru uygulanması (verifikasyon), ölçüm belirsizliği gibi matematiksel uygulamalar ağırlık kazanmaya başlamış ve genetik-serolojik esaslı analizler laboratuvarlarda giderek yaygınlaşmıştır.

Yeni geliştirilen ve kimi yerde modern kimi yerde ise yeni olarak tanımlanan bu yaklaşımların geçerliliği, standart yöntemlerle kıyaslanarak sınanmaktadır. Bir diğer deyişle, yeni bir analiz yaklaşımının uluslararası platformda geçerli olarak tanınması için en azından standart yöntemlere eşdeğer performans göstermesi zorunludur. Bu zorunluluk, bu kitabın yazıldığı tarihte geçerlidir, ancak ileride değişebilir.

Bu durumda klasik yöntemler günümüzde hâlâ geçerlidir ve FDA ile ISO gibi kuruluşlar bu yöntemleri esas almaktadırlar. Dolayısıyla gıdaların mikrobiyolojik analizinde bugün için standart yöntemler geçerlidir, ancak daha hızlı ve genetik-serolojik esaslı testlerde olduğu gibi daha doğru ya da daha duyarlı sonuç veren yöntemlerin de geçerliliği kabul edilmek zorundadır.

07.02. Klasik Yöntemler

Bu bölümde var/yok testleri, sayım, tanımlama testleri, toksin testleri, biyolojik stabilite testleri, hava/ yüzeylerin analizi ve titre belirleme testleri verilmiştir. Mikrobiyolojik analizlerde bunlara ilaveten başta antibiyotik direnç testleri (antibiyogram) ve bazı vitaminlerde miktar tayininin mikrobiyolojik olarak yapılması gibi daha pek çok mikrobiyolojik analiz vardır.

07.02.01. Var/yok Testleri

Gıdalarda bulunan patojen bakterilerin analizi genel olarak var/yok testleri ile yapılır. Bu testler, analizi yapılacak olan 25 g(mL) gıdada aranan patojenin var olup olmadığının kontrolüdür. Amaçlanan sonuç patojenin 25 g(mL) gıdada 0 sayıda olmasıdır. Sayı 0 değil ise analiz edilen gıda numunesinde sayının ne olduğu önemli değildir. Ayrıca var/yok testlerinin uygulanış şekli, aranan patojen varsa sayısını ortaya çıkartmaya yönelik değildir. Aranan patojenin sayısının 1 ya da 5.000 ya da çok daha fazla olması var/yok testleri için önemli değildir. Sonuç "var" olarak verilir.

Var/yok testlerinde önce bir zenginleştirme, sonra katı besiyerine sürme ve tanımlama aşamaları vardır. Bazı analizlerde zenginleştirme işlemi, ardışık iki aşamada yapılır.

Temel olarak 25 g(mL) gıda numunesi, 225 mL zenginleştirme besiyerinde inkübasyona bırakılır. Eğer varsa aranan patojenin sayısı bu aşamada artar. Selektif katı besiyerine ekim ve inkübasyon sonunda tipik koloniler biyokimyasal ve/veya serolojik yöntemlerle tanımlanır. Zenginleştirme işlemi yapıldığı için bu analiz sonunda sayının verilmesi mümkün değildir.

Bu analizler pek çok uluslararası standartta 25 g(mL) gıdada uygulanır. 250 mL içme/ kullanma suyunda koliform grup bakteri var/yok analizi şeklinde de yapılabilmektedir (bknz ⇒ 11. bölüm Su Mikrobiyolojisi).

Var/yok testleri, sadece patojen bakterilere uygulanmaz. Örneğin, bir ihalede 50 g reçelde ozmofilik maya olmaması istenebilir.

Tersine olarak, patojen olmakla beraber gıdalarda düşük sayılarda bulunmasına izin verilen bakteriler vardır. Gıda/ bakteri ilişkisi dikkate alınarak bazı gıdalarda *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium perfringens* için <100 KOB/ g(mL) ifadesi kullanılır. Buna göre, bu gıdalarda bu bakterilerden örneğin, 90 KOB/ g(mL) sayım sonucu elde edilirse bir sorun yoktur.

Bilinen en tehlikeli 4 gıda patojeninden birisi olan *Listeria monocytogenes* için Avrupa Birliği yasalarına göre "üretici firmanın normal depolama şartlarında sayısının artmayacağını garanti etmesi koşulu ile" gıdalarda 100 KOB/ g(mL) bulunmasına izin verilmektedir. Bu analiz, var/yok testleri ile değil doğrudan katı besiyerinde koloni sayım yöntemi ile yapılmaktadır. Devamında AB yasalarında var/yok testi yanında *Salmonella* gibi patojenler için de doğrudan katı besiyerinde sayım uygulaması gündemdedir. Bu konu, risk analizleri çerçevesinde değerlendirilmektedir.

Var/yok testi ile yapılan mikrobiyolojik analizlerde aranan mikroorganizma bulunursa testin geçerliği açısından bir sorun yoktur. Ancak sonuç "yok" olarak elde edilirse "gerçekten mi yok" sorusu her zaman akla gelir.

Yöntemin kendisinden gelen yetersizlik ya da operatörün hatalı uygulamaları sonunda gerçekte "var" olan bir patojen, analiz sonunda "yok" olarak bulunabilir. Bu, sahte (false) negatif sonuçtur. Analiz edilen gıdada 1 KOB/ 100 g *Salmonella* olduğunu varsayalım. Operatörün aldığı 25 g numunede bu bakterinin olma olasılığı sadece %25'tir ve burada sahte negatif bir sonuç yoktur.

Gıdalardaki patojen analizlerinde en büyük sorun aranan bakterinin stres altında olmasıdır.

07.02.01.01. Zenginleştirme/ Canlandırma

Gerek selektif zenginleştirme sıvı besiyerleri gerek zenginleştirme sonrası kullanılan selektif katı besiyerleri, refakatçi floranın gelişmesini baskılayacak çeşitli inhibitör maddeler içerir. Bu selektif maddeler, hedef mikroorganizmanın gelişmesini minimum düzeyde baskılarken refakatçi florayı maksimum düzeyde baskılar. Selektif inhibitör ile kasıt budur. Bir diğer deyiş ile bu kimyasallar geniş spektrumlu antibiyotik değildir. Besiyerlerindeki derişimleri hedef bakteriye minimum zarar verecek kadardır.

Ancak eğer hedef bakteri stres altında ise bu kimyasalların varlığından olumsuz etkilenir ve selektif besiyerinde gelişemez. Sonucun sahte "negatif" olarak alınmasındaki temel nedenlerden birisi budur (bknz ⇒ 04. Bölüm Besiyerleri, dipnot 05).

Bu sorundan kurtulmak için patojen analizlerinde bir ya da daha fazla (ardışık) zenginleştirme veya canlandırma işleminden sonra selektif katı besiyerine ekim uygulaması vardır.

Bakterinin hassasiyetine, çevresel faktörlerden ve/veya gıda işlemleri sırasında gördüğü olası zararlara göre selektif olmayan ön zenginleştirme ve arkasından selektif zenginleştirme olabileceği gibi doğrudan selektif zenginleştirme ile de analize başlanabilir.

Selektif olmayan ön zenginleştirmede hiçbir inhibitör içermeyen genel sıvı besiyerleri kullanılır. Burada amaç, hedef bakterinin sayısının artırılması değildir. Sadece selektif olmayan bu ortamda bakterinin "eğer stres altında ise" stres faktörlerinden kurtularak tam anlamı ile uyanması/ kendine gelmesi/ canlanması amaçlanır. Sonraki selektif zenginleştirme aşamasındaki temel hedef bakteri sayısının artmasıdır.

Zenginleştirme aşaması/ aşamaları çok genel olarak 18-24 saat sürer. Selektif olmayan ön zenginleştirme aşamasının 24 saat sürmesi koşulunda birtakım sakıncalara aşağıda *Salmonella* analiz örneği konusunda değinilecektir.

Canlandırma, kısa süreli bir selektif olmayan ön zenginleştirme olarak da tanımlanabilir. Çok genel olarak, 4 saatlik bir uygulamadır. Amaç, hasar görmüş olması muhtemel hedef bakterinin bu hasarını onarmasıdır. Selektif inhibitörler zenginleştirme besiyerine katılmadan önce 4 saat süre ile optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılan homojenizatta hedef bakterinin kendisini toparladığı ve aktif hale geçtiği kabul edilir.

Yukarıda verilen bilgilere göre, selektif olmayan bir besiyerinde ve uygun inkübasyon sıcaklığında 4 saat bekletme "canlandırma" ama yine selektif olmayan bir besiyerinde ve uygun inkübasyon sıcaklığında 16-24 saat süreli inkübasyon "ön zenginleştirme" olarak tanımlanmaktadır. Bu ikisi arasındaki fark, bakterinin genel olumsuz çevresel faktörlere karşı direnci/ duyarlığı ve bakterinin özel olumsuz çevresel faktörlere karşı direnci/ duyarlığıdır.

Buna göre, klinik mikrobiyoloji uygulamasında olduğu gibi *Salmonella* kuşkusu baskınsa dışkı doğrudan selektif katı besiyerine sürülebilir. *E. coli* O157:H7 analizinde ise ulusal ve uluslararası standartlarda doğrudan selektif besiyerinde zenginleştirme gösterilir, ancak gerekirse (laboratuvar yetkilisi şüpheye düşerse) analize canlandırma ya da selektif olmayan ön zenginleştirme ile başlanabilir.

Salmonella, *Listeria monocytogenes*[1] ve *E. coli* O157:H7 serotipi gibi gıda kaynaklı birincil (primer) patojenlerin gıdalarda bulunmasına izin verilmez. Çoğu uluslararası standartta analiz edilecek gıda miktarı 25 g(mL) olarak verilmektedir ve yasal olarak analiz edilecek gıda miktarını ifade eder. İstenirse gıda fabrikasında daha fazla miktarda numune analiz edilebilir. Çeşitli uluslararası standartlarda (özellikle FDA) çok daha fazla gıda numunesi analize

[1] *L. monocytogenes*'te durum farklıdır, bknz⇒ "09.14. Gıdalarda İzin Verilen *L. monocytogenes* Sayısı" bölümü.

alınır. Örneğin, bebek mamalarında EMS yöntemi ile *Cronobacter sakazakii* analizi için 333 g numune kullanılır.

Aşağıda üç farklı bakteri için var/yok testi uygulama örneği verilmiştir.

07.02.01.02. *Salmonella* Örneği

Standart analizde beş aşamalı bir uygulama vardır:

-Selektif olmayan sıvı besiyerinde ön zenginleştirme,

-Selektif sıvı besiyerinde zenginleştirme,

-Selektif katı besiyerine ekim,

-Şüpheli/ tipik kolonilerin biyokimyasal olarak tanımlanması,

-Biyokimyasal test sonuçlarına göre *Salmonella* olduğu kanısına varılan izolatlarda serolojik doğrulama.

Selektif olmayan ön zenginleştirmede tamponlanmış peptonlu su (TPS) besiyeri kullanılır. 25 g(mL) gıda numunesi, 225 mL TPS besiyerinde 37 ºC'ta 16-20 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Gıdada *Salmonella* bulaşması (kontaminasyonu) varsa fekal kontaminasyonun da çok yoğun olması beklenir ve fekal kontaminantlar (bulaş) arasında *E. coli* gibi *Salmonella* serotiplerine kıyasla olumsuz çevresel koşullara çok daha dirençli bakteriler de vardır. Bu refakatçi flora, selektif olmayan ön zenginleştirme sırasında çok hızlı bir şekilde gelişerek ortamda baskın hale gelebilir.

Bu durum, *Salmonella* analizini hiç etkilemez. Amaç, sadece hasar görmüş olması muhtemel olan *Salmonella* spp.'nin aktif duruma getirilmesidir. TPS, tampon içerdiği için refakatçi flora tarafından oluşturulan asitlikten etkilenmez. Bu besiyeri, ISO 6579'a uygun olarak standart *Salmonella* analizi için kullanılır.

TPS'de tampon maddeler varsa da, olası bir yüksek asit oluşumu sonrası *Salmonella* spp.'nin zarar görmemesi için selektif olmayan ön zenginleştirme aşamasının 18 saati geçmemesi önerilmektedir.

ABD/ FDA kaynaklı *Salmonella* analiz yönteminde ise TPS yanında laktoz broth (LB) besiyeri de kullanılır. Ancak;

-*Salmonella*, laktoz negatif bir bakteridir, oysa refakatçi florada bulunması olası *E. coli*, laktoz pozitiftir. Dolayısı ile bu besiyerinde *E. coli*, enerji kaynağını kolayca laktozdan sağlarken *Salmonella*, biraz daha zor olarak enerji kaynağını besiyerindeki peptondan sağlayabilmektedir.

-Besiyerinde tampon olmadığı için refakatçi floranın laktozdan oluşturacağı asit, duyarlı bir bakteri olan *Salmonella* spp.'nin aktif formunu dahi strese sokabilir. Tamponlama, sadece ön zenginleştirmeye alınan gıda numunesinden (örneğin et ve et ürünleri) sağlanabilir.

Dolayısı ile bu besiyerinde uzun inkübasyon süresi, sahte negatif sonuç almak için yeterli koşulları sağlayabilir. Bununla beraber kurallara uygun olarak LB ile

yapılan ön zenginleştirmede sorun görülmesi beklenmemektedir, ancak her koşulda mantık hatası vardır.

Selektif olmayan ön zenginleştirme aşamasını selektif zenginleştirme izler. Bu amaçla geliştirilmiş çok sayıda selektif zenginleştirme besiyeri bulunmakla beraber ISO 6579'e uygun olarak standart analizde kullanılan iki selektif besiyeri vardır: Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth ve Rappaport-Vassiliadis (RVS) broth. Selektif olmayan ön zenginleştirme kültüründen bu besiyerlerine ekim yapılır ve tüpler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Buradaki önemli bir ayrıntı, RVS broth besiyerinin 41,5 ^{o}C'ta inkübe edilmesidir. Yüksek inkübasyon sıcaklığı, refakatçi floranın bir kısmını baskılar.

Daha sonra her 2 selektif zenginleştirme besiyerinden 2'şer adet selektif katı besiyerine sürme yapılır. İlgili ISO standardına göre[2], bu besiyerlerinden birisi xylose lysine deoxycholate (XLD) agar olmak zorundadır. Diğeri kullanıcının tercihine bırakılır.

Ekimi yapılmış 4 selektif katı besiyerinin herhangi birinde 1 adet dahi *Salmonella* varlığı tespit edilirse sonuç "var" olarak verilir.

Yaklaşık 2600 *Salmonella* serotipinin tümünün aynı selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerinde gelişebilmesi beklenmemektedir. Bu nedenle iki farklı selektif zenginleştirme ve iki farklı selektif katı besiyeri kullanılır.

Gıda analizlerinden çok farklı olmak üzere klinik mikrobiyolojide *Salmonella* enfeksiyonuna maruz kaldığı düşünülen bir kişinin dışkısı, doğrudan selektif katı besiyerine sürülerek tipik koloni elde edilmeye çalışılır. Burada tüm zenginleştirme aşamalarının hastanın bağırsağında tamamlanmış olduğuna dikkat çekilmektedir.

07.02.01.03. *Listeria monocytogenes* Örneği

Bu analizde de iki aşamalı bir zenginleştirme vardır ama *Salmonella* analizinde olduğu gibi selektif olmayan bir ön zenginleştirme değil, daha farklı bir uygulama yapılır.

İlk aşamada selektif inhibitörler, zenginleştirme besiyeri bileşimine asıl zenginleştirme besiyeri bileşimindeki derişimin yarısı kadar olacak şekilde katılır (1/2 Fraser broth). Buradan yapılan yarı selektif ön zenginleştirme sonrasında selektif zenginleştirme ve oradan katı besiyerine ekim aşaması vardır. ISO 11290, Fraser broth zenginleştirme aşamalarını tanımlamaktadır. Selektif katı besiyeri olarak iki farklı besiyeri kullanılır. Bunlardan biri

[2] Okuyucu standartlarda, zaman içindeki değişiklikleri izlemek durumundadır.

kromojenik karakterli "ALOA[3] (Agar Listeria Ottaviani & Agosti)" iken diğeri kullanıcının tercihine bırakılmıştır.

Listeria monocytogenes analizinde, diğer patojenlerden farklı olmak üzere yarı selektif zenginleştirme sonunda, selektif zenginleştirmenin 24 ve 48. saatlerinde ikişer selektif katı besiyerine ekim yapılır.

Salmonella analizinde 1 adet selektif olmayan ön zenginleştirme, 2 adet selektif zenginleştirme 4 adet selektif katı besiyeri kullanılırken *E. coli* O157:H7 analizinde 1'er adet selektif zenginleştirme besiyeri ve selektif katı besiyeri vardır. *L. monocytogenes* analizinde ise durum çok farklıdır. Yarı selektif zenginleştirme sonunda 2 adet, selektif zenginleştirmenin 24. saat inkübasyonu sonrasında 2 adet ve selektif zenginleştirmenin 48. saat inkübasyonu sonrasında 2 adet olmak üzere toplam 6 adet selektif katı besiyerine ekim yapılır. Bu 6 selektif katı besiyerinin herhangi birisinden *L. monocytogenes* izole edilirse analiz edilen örnekte *L. monocytogenes* olduğuna karar verilir ve parti reddedilir.

Canlandırma işlemi için tipik örneklerden birisi de *L. monocytogenes* analizidir. Analize başlarken önce 25 g(mL) gıda, selektif inhibitör katkısı henüz eklenmemiş ve genel besiyeri bileşiminde olan 225 mL Fraser broth bazal besiyerine eklenir. Bu şekilde 4 saat inkübe edilir. Hasar görmüş (stres altında) olması beklenen *L. monocytogenes*'in bu aşamada hasarını tam olarak gidermesi beklenir. Bu süre sonunda yarı selektif derişimde olmak üzere selektif inhibitörler bazal besiyerine eklenip inkübasyona devam edilir. Burada selektif olmayan bir ön zenginleştirme yoktur. Sadece hasar görmüş olması muhtemel olan hedef bakterinin kendini toparlaması (stresten kurtulması) için bir bekleme süresi vardır. Bu uygulama ISO 11290'da yoktur. Operatörün *L. monocytogenes*'in hasar görmüş olmasından endişe etmesi koşulunda ve analiz raporunda belirtilmesi kaydı ile uygulanmasında sakınca yoktur.

07.02.01.04. *E. coli* O157:H7 Örneği

E. coli O157:H7 analizinde doğrudan selektif sıvı besiyerinde zenginleştirme ve ardından selektif katı besiyerine ekim ile biyokimyasal/ serolojik tanımlama işlemleri vardır. Bu bakterinin analizinde selektif olmayan ön zenginleştirme aşamasına gerek duyulmaz.

Salmonella spp.'den farklı olarak *E. coli* O157:H7, çevresel stres faktörlerine daha dirençlidir. Ayrıca stres altında olsa bile kullanılan selektif inhibitörlere olan direnci (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu), refakatçi flora ile kıyaslandığında yeterlidir.

[3] Aynı besiyeri farklı ticari firmalarda farklı isimlerle anılabilmektedir. Örneğin, ALOA besiyeri, Merck tarafından "Chromocult Listeria Selective Agar base acc. Ottaviani and Agosti" adı ile pazarlanmaktadır.

07.02.01.05. Diğer Örnekler

-İçme ve kullanma sularında *Salmonella* aranmasında 250 mL numune filtreden geçirilir. Filtre doğrudan selektif bir besiyerine yerleştirilirse hasar görmüş *Salmonella*, bu selektif besiyerinde koloni oluşturamayabilir ve sonuç sahte negatif olarak alınabilir. Filtrenin 50 mL kadar TPS besiyerine bırakılması ve devamında 07.02.01.02. bölümde verildiği gibi devam edilmesi ile doğru sonuç alınır. Bu uygulamada 225 mL TPS kullanılması gerekli değildir.

-Işınlanarak sterilize edilmiş dehidre LMX besiyeri, belirli miktar su numunesine ilave edilip karıştırılır ve 37 ^{o}C'ta 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin yeşile dönmesi, analizi yapılan su numunesinde koliform bakteri olduğunu gösterir. Bu amaçla hazırlanmış ReadyCult Coliforms ve ReadyCult Enterococci gibi ticari preparatlar bulunmaktadır. Bu kitler, belirli hacim (50 ve 100 mL) su numunesi için hazırlanmıştır.

-Yine ışınlanarak sterilize edilmiş CASO (tryptic soy) broth, serum gibi steril olması gereken sıvılarda sterilite kontrolü için kullanılır. Analiz edilecek seruma gereken miktar (30 g/L) besiyeri tartılarak ilave edilir, karıştırılıp inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda renkte bulanma olması serumun steril olmadığını (içinde bakteri var olduğunu), besiyeri berrak rengini koruyorsa steril (içinde bakteri olmadığını) gösterir. ReadyCult kitlerinden farklı olarak bu besiyeri laboratuvar ortamında steril şartlar altında tartılarak seruma ilave edilir.

07.02.02. Sayım

Gıdalarda, çevresel numunelerde, yüzeylerde, havada vb. materyalde mikroorganizma sayımı yapılabilir. Gıda mikrobiyolojisi açısından mikroorganizma sayımı, genellikle gıdalarda bulunmasına izin verilen sayının altında ya da üstünde olduğunun kontrolüdür.

Bütün gıdalar steril değildir ve steril olmaları da gerekmez. Steril olmayan gıdalarda belirli sayılarda mikroorganizma bulunmasına izin verilir. Hangi gıdada, hangi mikroorganizmaya, ne sayıda izin verileceği doğrudan gıda çeşidi ve mikroorganizma türü ile ilişkilidir. Buna göre, *Staph. aureus*, *B. cereus* ve *Cl. perfringens* gibi patojen bakterilerin de düşük sayılarda olmak kaydı ile bazı gıdalarda bulunmalarına izin verilir.

Mikroorganizma sayımında asıl önemli olan canlı hücre sayısının belirlenmesidir. Canlı hücre sayımı ise asıl olarak koloni sayımı ile yapılır. Bununla beraber En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemi ve bunun başta mikrotiter plak yöntemi gibi modifikasyonları da uluslararası standartlarda yer almıştır.

Gıdalarda mikroorganizma sayımı 08. Sayım Yöntemleri bölümünde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Bazı standart analiz yöntemlerinde var/yok testi ile sayım yöntemleri arasında küçük kavram kargaşaları görülebilmektedir. Bunun en tipik örneği içme ve kullanma sularında koliform bakteri analizidir. Analizin uygulanmasında

membran filtrasyon yöntemi kullanılır. Buna göre 250 mL su numunesi membran filtrasyon yöntemi ile analiz edilir ve membran filtre, uygun bir besiyerine yerleştirilerek inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda beklenen sonuç, 0 sayıda tipik kolonidir. 1 ve daha fazla tipik koloni oluşursa ilave testler ile koliform grup doğrulaması yapılır, koliform pozitif sonuç alınırsa ilgili üretim partisi reddedilir. Bu bakış açısı ile bu analiz, bir anlamda var/yok testidir.

Burada bir çelişki ya da kavram kargaşası yoktur. Membran filtrasyon, bir analiz yöntemidir. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi teknik ayrıntıdır.

07.02.03. Tanımlama

Herhangi bir mikrobiyolojik analizde elde edilen koloninin tanımlanması gerekebilir. Tanımlamada esas olan, mikroorganizmanın cins ve türünü belirlemektir. Ancak bazı uygulamalarda grup (örneğin, koliform grup bakteriler), cins (örneğin *Salmonella*), familya (örneğin *Enterobacteriaceae*) düzeyindeki tanımlama da yeterli olabilmektedir.

Örneğin, Fluorocult VRBL agar kullanılarak yapılan standart bir gıda analizinde tipik koloniler elde edilirse ilk aşamada sadece grup düzeyinde koliform belirlenmiş olur. Bu kolonilerin hangi tür olduğu, sadece *E. coli* açısından önemli olabilir. Uzun dalga boylu UV lamba altında Petri kutusunda hiçbir koloninin floresan ışıma vermediğini varsayalım[4].

Bu tipik kolonilerin *E. coli* dışındaki koliform grup üyelerinden hangisi olduğu gıda sanayisini ve kamu tarafından yapılan günlük (rutin) kontrolleri ilgilendirmez. Çünkü gıda sanayisi açısından *E. coli* dışındaki koliform grup üyesinin türünün belirlenmesi, herhangi bir ilerleme sağlamayacaktır. Bir diğer deyiş ile söz konusu kolonilerin *Citr. freundii* ya da *Ent. aerogenes* olduğu saptanırsa türe özel bir koruyucu/ önleyici uygulama söz konusu değildir.

Ancak gıda numunesinin analizinde standart VRBL agar kullanıldığı ve inkübasyonun 44,5 ^{o}C'ta yapıldığını varsayalım. İnkübasyon sonunda tipik koloni gelişmesi olursa fekal kontaminasyonu kanıtlar ve bu aşamada koloni(ler)in *E. coli* olup olmadığı önemli değildir. Bu sonuç işletme açısından önemlidir ve fekal kontaminasyonun önlenmesi için gereken ilerlemeyi (düzeltici/ önleyici faaliyet) sağlamak durumundadır.

Tanımlama testleri konusunda, 06.03. İzolasyon ve Tanımlama ile 06.04. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler bölümlerinde ayrıntılı bilgi bulunmaktadır.

Herhangi bir gıda analizinde izole edilen küfleri tanımlama isteği sıklıkla sorgulanmaktadır. Küflerin depo küfü, makine küfü, tarla küfü vb. şekillerde kesin olarak gruplandırılması ve buna göre düzeltici/ önleyici faaliyette bulunulması çok genel olarak mümkün değildir. Küfler, basit olarak rüzgâr etkisi

[4] *E. coli* O157:H7 suşlarının MUG negatif olduğu bir kez daha hatırlatılmaktadır.

ile her zaman ve her yerde bulunabilir. Buna göre izole edilen küfün tanımlanması mikotoksin dışında çoğu kez hiçbir anlam ifade etmeyecektir.

07.02.04. Toksin Testleri

Enfeksiyon tipi gıda kaynaklı hastalık yapan mikroorganizmalardan farklı olarak intoksikasyon yapanlarda mikroorganizma, gıda maddesi üzerinde gelişerek toksin oluşturur. Daha sonra mikroorganizma otosterilizasyon nedeni ile ölse, öldürülse ya da bir şekilde gıdadan uzaklaştırılsa bile toksin gıda üzerinde kalır.

Dolayısı ile gıdanın mikrobiyolojik analizinde aranan mikroorganizma bulunmaması, o mikroorganizma toksininin olmadığı anlamına gelmez. Tersine olarak aranan mikroorganizmanın bulunması, o mikroorganizmanın gelişerek toksin yapacağı anlamına da gelmez. Gıdanın düşük su aktivitesi, yüksek asitlik vb. gibi koruyucu faktörleri, söz konusu mikroorganizmanın gelişmesini engelleyebileceği gibi gelişse bile toksin oluşturmasını da engelleyebilir.

Dolayısı ile bu gibi patojenlerin mikrobiyolojik yönden analizi yerine doğrudan toksinlerinin belirlenmesi çok daha akılcı görülmektedir. Nitekim *Aspergillus flavus* yerine doğrudan aflatoksin analizi çok yaygın olarak uygulanmaktadır.

İntoksikasyon tipi zehirlenmelerde *Staph. aureus* önemli bir bakteridir. Analizi oldukça kolaydır. Toksin testi için geliştirilmiş kitler de vardır. Mikrobiyolojik olarak canlı bakteri sayısının belirlenmesi, sadece bu bakterinin potansiyel tehlikesini gösterir. Çeşitli salatalar ve soslar gibi *Staph. aureus* açısından riskli gıdalarda, tüketime sunulmadan hemen önce toksin testi yapılması daha doğru görülmekle beraber analiz maliyeti ve laboratuvar koşulları açısından çok sınırlı bir uygulamadır.

07.02.05. Biyolojik Stabilite Testleri

Bu testler, üretim teknolojileri gereği steril olmayan, ancak yoğun şeker konsantrasyonu, asitlik, koruyucu madde ilavesi vb. gibi şekillerde korunan ve marketlerde standart rafta pazarlanan (soğutulmasına gerek olmayan) reçel, ketçap, soslar vb. gibi gıdalarda yaygın olarak uygulanır. Ürün içinde canlı mikroorganizma bulunabilir, ancak bunların çoğalarak ürünü bozmaması önemlidir. Reçel içinde, spor formunda bakteri canlı olarak kalabilir. Reçeldeki asitlik ve yoğun şeker miktarı, sporun germine olmasına ve bakterinin çoğalmasına izin vermez ya da bu işlemi çok yavaşlatır. Böylece ürün, raf ömrü boyunca mikrobiyolojik olarak stabil kalır.

Bir reçel numunesi mikrobiyolojik olarak analiz edildiğinde, besiyerinde reçelden gelen asitlik ve şeker baskılaması ortadan kalkacağı için bakteri sporları hızla germine olur ve çoğalarak koloni oluştururlar. Ancak aynı bakterinin reçel ortamında bu şekilde gelişmesi söz konusu değildir.

Biyolojik stabilite testinde hızlandırılmış raf ömrü testleri ile ürünün mikrobiyolojik açıdan stabil olup olmadığı araştırılır. Basit olarak ürün, farklı inkübasyon sıcaklıklarında ve tercihen çalkalamalı bir inkübatörde 1-2 hafta kadar tutulur. Bu süre sonunda üründe duyusal testler, pH ölçümü, gıda uygunsa mikroskobik analizler ya da doğrudan kültürel sayım vb. uygulamalarla ürünün mikrobiyolojik olarak bu süre içinde değişip değişmediği kontrol edilir. Biyolojik stabilite testi sadece saprofitlerin ürünü bozup bozmayacağının kontrolü için uygulanır.

07.02.06. Hava ve Yüzeylerin Analizi

Başta çalışma tezgâhları, ambalaj materyali ve çalışanların elleri olmak üzere çeşitli yüzeylerde hedef mikroorganizmanın (örneğin *E. coli*) bulunmaması ya da belirli bir sınırın altında olması (örneğin toplam aerobik koloni sayısı <10 KOB/cm^2) istenebilir. Bu değerler gıda işletme çeşidine göre önemli ölçüde değişir ve bugün için yasal olarak belirlenmiş sınır değerler genellikle yoktur. Her gıda işletmesi kendi iç standardını yapmak durumundadır.

Çalışanların ellerinden örnek almak denildiğinde öncelikle akla gelen *E. coli* aranmasıdır. Bu amaçla çok genel olarak üretimde çalışan personelin sol elinin işaret, orta ve yüzük parmaklarının avuç içine bakan tarafı "parmak izi kalacak, ancak besiyeri yırtılmayacak şekilde" uygun bir *E. coli* katı besiyerine değdirilir. İnkübasyon sonunda tipik koloni gelişmesine bağlı olarak değerlendirme yapılır.

Yüzey kontrolleri için yaygın olan uygulamada, steril su ile ıslatılmış steril svap (swab; sürtme) çubukları, alanı belirli bir yüzeye sürülür, sonra bu çubuk ya katı besiyerine sürülür ya da sıvı 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 uygun yöntemlerden birisi, bu amaçla hazırlanmış hafif bombeli kontakt Petri kutuları ya da kontakt slaytlar kullanılmasıdır.

Kontakt Petri kutuları, genellikle 25 cm^2 yüzeyde analiz yapmak için tasarlanmıştır. Bulunan sonuçlar 4 ile çarpılarak 100 cm^2 alandaki mikroorganizma sayısı belirlenir. Kontakt slaytlar ise bükülebilir özelliği ve iki tarafı farklı besiyeri içermesi sayesinde yaygın kullanım alanı bulmuştur.

Havadan örnek alınması da tartışma konusudur ve bunun da gıda sanayisinde belirli bir standardı yoktur. İşletmelerde ağzı tam açık bırakılan Petri kutusu ile havadaki mikroorganizma sayısının belirlenmesi oldukça yaygın bir yöntem olmakla beraber sadece kabaca bilgi verir. Bu yöntemde havadaki mikroorganizma yoğunluğuna göre 1; 5; 10; 30 vb. dk açık bırakılan Petri kutusunda inkübasyon sonrası sayım yapılır ve sonuç örneğin 28 KOB/ Petri kutusu alanı cm^2/10 dk toplam aerobik koloni şeklinde verilir. Amaca göre Petri

kutusunda bulunan besiyeri toplam aerobik koloni ya da toplam maya küf için hazırlanır.

Mikroorganizmalar, havada spor formunda bulunur. Buna göre standart uygulamada koliformlar vb. bakteriler için havadan örnek almaya gerek yoktur.

Havadaki mikroorganizma sayısı asıl olarak bu amaç için geliştirilmiş cihazlarla yapılır ve belirli bir hacim hava numunesindeki toplam aerobik koloni ya da toplam maya ve küf sayısı belirlenir. Çarptırma yöntemi olarak bilinen bu uygulamada basit olarak hava, vakum pompası ile çekilir (Şekil 07.01) ve delikli bir kapaktan (Şekil 07.02) geçerek cihaz içine yerleştirilmiş ve kapağı açık bırakılmış Petri kutusundaki katı besiyerine çarpar. İnkübasyon sonunda bu deliklere karşı gelen pozitif alanlar sayılarak bir çeşit EMS olarak havadaki mikroorganizma yükü hesaplanır. Bu cihazlar, işletmede standart veri sağlamak için kullanılır.

Şekil 07.01. Havadan örnek alma cihazı

Bu yöntemde özellikle yüksek hacimler ve/veya kuru ve sıcak havalarda analiz edilen hava numunesi ile çalışıldığında besiyerinin kuruma riski vardır.

Dolayısıyla besiyeri, 4-5 mm kalınlıkta olacak şekilde Petri kutusuna dökülmelidir.

Şekil 07.02. Delikli kapak

Havadaki mikroorganizma sayısının belirlenmesinde bir diğer uygulama impinger yöntemidir. Emilen hava, yüksek bir hızla steril bir tampon çözelti içinden geçirilir. Bu sırada havadaki mikroorganizmalar sıvıya geçer ve bu sıvının standart mikrobiyolojik analizi ile havadaki mikroorganizma sayısı bulunur. Sıvıya geçirilen hava miktarı otomatik olarak ayarlanabilir.

İmpinger yönteminde elde edilen sayım sonuçları, hava emme yöntemlerinden daha fazla çıkabilir. Bunun nedeni havadaki toz partiküllerine birden fazla sayıda mikroorganizmanın tutulmuş olabileceğidir. Bu toz partikülleri üzerindeki mikroorganizmalar, çarptırma ya da filtre yönteminde tek koloni oluşturacak iken havanın su ortamından geçirilmesi sırasında toz partikülünden ayrılarak ayrı ayrı koloni oluştururlar. Buna göre çarptırma ya da aşağıda açıklanacak olan filtre yöntemine göre kabul edilecek sayıda mikroorganizma içeren hava numunesi, impinger yöntemi ile elde edilen sonuca göre "limitlerin üzerinde" şeklinde değerlendirilebilir. Bu yöntem, yoğun bir kullanım alanı bulmamıştır.

Hava numuneleri ile çalışılırken kullanılan bir diğer sistem, membran filtre yöntemidir. Çarptırma yönteminde doğrudan katı besiyeri kullanılırken membran filtre yönteminde yine vakum ile çekilen hava, özel bir jelatin ile

kaplanmış membran filtreye çarpar. Bu membran filtre, daha sonra uygun bir besiyerine yerleştirilir. Bu uygulamada filtre üzerindeki özel jelatin, filtrenin kurumasını önler. Dolayısı ile söz konusu membran filtre ile farklı iklim koşullarında ve emiş miktarlarında da standart sonuç alınır.

Yüzeylerde Hijyen Analizi

Gıda işletmelerinde gıdanın temas ettiği yüzeylerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan temiz olması gerektiği açıktır. Bu bölümde sadece yüzeylerde biyolojik hijyen analizleri verilmiştir.

Çalışma tezgâhı gibi bir yüzeyde mikrobiyolojik analizler en erken olarak 18-24 saat inkübasyon sonunda alınabilir ve bu süre, işletme koşullarında gereken önlemlerin alınabilmesi için çok uzundur. Bunun yerine, sadece 1-2 dakika gibi kısa bir süre içinde sonuç veren genel hijyen analizleri, yüzeyde genel biyolojik hijyen açısından işletmeye önemli bilgi verir. Bu konuda farklı ticari markalar tarafından piyasaya sürülmüş onlarca farklı ürün vardır.

Bu ürünler, hiçbir koşulda analiz yapılan yüzeyde canlı mikroorganizma sayısı hakkında kesin bilgi vermez, sadece organik madde yükü hakkında genel bir fikir verir.

Bunlardan Hy-Rise sistemi (şekil 07.03), nicotinamide adenine dinucleotides (NAD ve NADH) ve nicotinamide adenine dinucleotide phosphates (NADP ve NADPH) belirlenmesi ile çalışır. Bu grup bileşenler, yaşayan tüm hücrelerde ve gıda atıklarında bulunur.

Şekil 07.03. Hy-Rise Sistemi

Eğer analiz yapılan yüzeyde NAD(P) ve/veya NAD(P)H varsa Gluc-DH, ß-D-Glikozu D-Gluconolactone'a çevirir ve ardından Diaphorase, tetrazolium tuzunu renkli formazan tuzuna dönüştürür. Test sonunda renk oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir ve renk ne kadar koyu ise göreceli olarak yüzey o kadar kirlidir (organik madde vardır), yeniden temizlik gerekir.

Gıda işletmelerinde yüzey hijyen kontrolü için en yaygın kullanılan kitler, ATP'ye dayalı ölçümlerdir. Bu kitlerle yapılan ölçümde Relative Luminescence Unit (RLU) olarak sayısal bir değer elde edilir ve dolayısıyla işletmede hijyen izlenmesinde kayıtların tutulması açısından yararlıdır (Şekil 07.04).

ATP, lusiferase enzimi katalizörlüğünde lusiferase ile okside olur ve bir ışıma gerçekleşir. Bu reaksiyon, ateşböceğinde tipiktir. Oluşan ışıma, bir luminometre ile ölçülerek sayısal bir değer elde edilir.

Şekil 07.04. Hy-Lite Sistemi

Her ne kadar ATP, yaşayan hücrelerde temel enerji kaynağı olmakla birlikte, örneğin UHT sütte somatik hücre varlığına bağlı olarak da ATP ölçülür. Bir diğer deyişle, steril olsun ya da olmasın tüm organik materyalde ATP vardır. Bu ATP, bakteriyel olmayan (non-bacterial) ATP olarak tanımlanır.

Bir çalışma tezgâhına steril (UHT) süt bulaştığını varsayalım. Bu süt, mikroorganizma gelişmesi için bir potansiyel kirliliktir.

ATP'ye dayalı ölçüm sonunda kabul edilebilir RLU değeri üzerinde bir sonuç alınırsa temizliğin yeterli şekilde yapılmadığı anlaşılır.

Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren asıl konunun canlı mikroorganizmalar olduğu kesindir. Buna göre, yüzeyde yapılan hijyen testinde RLU ne kadar düşük ise canlı hücre sayısının o denli az olduğu var sayılabilir. Ancak yüksek RLU değerleri mutlaka canlı hücre sayısının yüksek olduğunun kesin göstergesi değildir, sadece organik yükün fazla olduğuna işaret eder.

Bir yüzeyde ATP'ye dayalı elde edilen RLU değerleri ile eş zamanlı olarak aynı yüzeyde toplam aerobik koloni sayılması ve bunlar arasında bir korelasyon oluşturulması üzerine pek çok bilimsel çalışma yapılmış olmakla beraber bu konuda sağlıklı sonuç alınamayacağı gibi hatalı yönlendirmeler ile de karşılaşılabilir. Çünkü:

-Örneğin maya hücreleri bakteri hücrelerine kıyasla 50 kat daha fazla ATP içerirler,

-Aynı bakteri olsa dahi gelişme kurvesinin farklı aşamalarında üretilen ATP farklıdır,

-Ortamda bakteriyel olmayan ATP de bulunabilir.

07.02.07. Titre Belirleme

Bir numunedeki mikroorganizma düzeyini "pozitif sonucun alındığı en seyreltik seyrelti" ile belirleyen bir yöntemdir. Rutin test dilüsyonu adı ile de anılır/ bilinir. Yöntemin uygulanmasında numuneden standart seyreltiler hazırlanır. Seyreltmenin hangi basamağa kadar gideceği amaca ya da beklenen/ kabul

edilen sayıya göre değişir. Seyreltme standart 1:9 şeklinde yapılabileceği gibi amaca göre 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 .... şeklinde de yapılabilir.

Seyreltmeler yapıldıktan sonra her seyrelti tüpünden ayrı ayrı olmak üzere içlerinde amaca uygun sıvı besiyeri bulunan tüplere 1'er mL aktarılır. Uygun sıcaklık, süre ve atmosfer ortamındaki inkübasyondan sonra tüplerin pozitif ya da negatif oldukları kontrol edilir. Değerlendirme kuralları EMS yöntemindeki gibidir (bknz⇒ 08.02. En Muhtemel Sayı bölümü).

Aşağıda Çizelge 07.01'de LST+MUG besiyerinde koliform bakteriler ve *E. coli* için titre belirlenmesi üzerine bir örnek verilmiştir.

Çizelge 07.01. Titre belirlenmesi için örnek

Bakteri	Seyreltiler			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Koliform Grup	+	+	+	–
E. coli	+	–	–	–

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 numunede, koliform grubun titresi 10^3 ve *E. coli* titresi 10^1 olarak verilir. Bu örnekte *E. coli* 10^{-2} seyreltide (–) sonuç vermiş iken 10^{-3} ve/veya 10^{-4} seyreltide (+) sonuç verirse titre belirleme çalışması, en baştan başlamak üzere yeniden yapılır.

Damlatma yöntemi ile de titre belirlenebilir (bknz⇒ 07.06.01.03. Damlatma Yöntemi).

Titre belirlenmesi, faj düzeyi (faj titresi), antikor düzeyi (titresi) belirleme vb. gibi çalışmalarda da kullanılır. Özellikle klinik mikrobiyoloji uygulamalarında antikor titresi belirleme çalışmalarında seyreltme sıklıkla 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 .... şeklinde yapılmaktadır.

07.03. Yeni ve Hızlı Yöntemler

Mikrobiyolojik analizlerde en büyük dezavantaj göreceli olarak uzun analiz süresidir. Küf analizlerinde inkübasyon süresi standart olarak 5 gündür. *Salmonella*, *Listeria* gibi patojenlerde ekim yapılan Petri kutusunda hiçbir tipik koloni gelişmemesi koşulunda analiz sırası ile 3 ve 4 gün sürer. Tipik olan ve olmayan koloniler varsa basit biyokimyasal testlerle ön tanımlama için ilave 2 gün gerekir. Şüpheli kolonilerin doğrulanması için ise genellikle ilave 3 güne gerek vardır.

EMS yöntemiyle *E. coli* analizi önceki standartlarda 8 gün sürerken yeni standartlarda bu süre 3 güne inmiştir. Bu denli uzun süren analizler halk sağlığına olumsuz etki yaparken ekonomik kayıplara da yol açabilmektedir.

1960'lı yıllarda hızlı ve yeni yöntemlere ilgi başlamıştır. Önceleri klinik mikrobiyolojide rağbet gören bu yeni yöntemlere gıda sanayisi 1990'lu yıllardan sonra giderek artan bir ilgi göstermiştir. Yeni olarak tanımlanan bu yöntemlerin en önemli özelliği, standart analiz yöntemlerine kıyasla daha kısa sürede sonuç vermesidir. Bu şekilde bir yandan halk sağlığı daha fazla güvence altına alınırken diğer taraftan hastalıklara bağlı olarak sigorta şirketlerine ödenen giderlerde azalma sağlanmıştır.

Otomasyon öncelikle personel giderlerini azaltmıştır. Bu şekilde daha az personel ile daha fazla analiz yapılabilmektedir. Gelişmiş genetik ve immünolojik teknikler ise analizlerde duyarlığı artırmıştır. Devamında analiz süresinde kayda değer kısalmalar sağlanmaktadır.

Gıda analizleri açısından yeni tekniklerde ilk ciddi uygulama stomacher kullanılmasıdır. Analiz edilecek numunenin homojenizasyonu için kullanılan bu cihaz, analiz süresini kısaltmaz ve personel giderlerinde bir azaltma sağlamaz. Sadece numunenin iyi bir şekilde homojenize edilmesini sağlar ve buna bağlı olarak olası sahte negatif sonuçları daha fazla önler.

Otomatik koloni sayma cihazları, personel giderlerinde çok ciddi bir azaltma sağlar. Bu cihaz ile bir Petri kutusunda sayım sonucunun alınması sadece birkaç saniye sürer. Spiral plater, analizde ekim süresini azaltan bir cihazdır. Petri kutusuna ekimi robot yapar, standardizasyon sağlanır, personel giderleri azalır. EMS yöntemi ile ekim için seyreltmeleri kendisi yapıp özel tüplere ekim yapan robotlar da geliştirilmiştir.

Direct Epifluoresance Filter Technique (DEFT) uygulamasında sayım yapılacak numune membran filtreden geçirilir ve acridine orange ile boyanıp epifloresan (epifluoresance) mikroskobunda incelenir. Canlı hücreler, portakal-kırmızı-sarı-kahverenginde boyanırken ölü hücreler yeşil floresan verir. Bu şekilde canlı ve ölü hücre ayrıldığı için kültürel yöntemle kıyaslanmayacak kadar kısa sürede sayım sonucu elde edilebilir. Yöntemin temel dezavantajları, operatörün deneyimli olmasını ve sayım yapılacak numunenin membran filtreden geçirilebilme özelliğinde olmasını gerektirmesidir. Ayrıca acridine orange boyası mutajenik özellikte olduğu için çalışılırken özel önlem almak gerekir. Florojen antikorlar ile DEFT kombine edilerek belirli bir mikroorganizmanın (örneğin *E. coli* O157) sayımı ya da zenginleştirme kültüründe var/yok analizi için çalışmalar sürdürülmekte ise de yöntemin uygulamadaki dezavantajları bu araştırmaların yoğunluğunu olumsuz yönde etkilemektedir.

Tanımlamada otomasyon giderek yaygınlaşmaktadır. Mikroorganizma gruplarına göre hazırlanan kitlerde biyokimyasal test besiyerleri dehidre olarak kuyucuklara yerleştirilmiştir. Tanımlanması istenen bakteri kolonisi steril su içinde çözülüp kuyucuklara ilave edilir ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda her kuyucuktaki renk değişimi pozitif ya da negatif olarak değerlendirilir ve buna göre bakterinin cins ve türü belirlenir. Okumayı otomatik olarak yapan robotlar ile sonuç çok daha kesin olarak saptanır.

Her mikroorganizmanın hücre duvarındaki yağ asidi kompozisyonu farklıdır. Şahit saf kültürler ayrı ayrı analiz edilip bir veritabanına (kütüphane) kaydedilir. Tanımlanması istenen bakterinin hücre duvarındaki yağ asidi kompozisyonu belirlendikten sonra bu veritabanı ile kıyaslanarak işlem bitirilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), immünomanyetik separasyon (IMS), DNA prop gibi genetik/ serolojik yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. PCR, standart kültürel yöntemlerle kıyaslandığında analiz süresinde çok ciddi kısalma sağlamaktadır. IMS, manyetik küreciklere bağlanmış antikorlar aracılığı ile analiz süresinde makul bir kısalma sağlamanın yanında analiz duyarlığında artış getirir.

Moleküler tekniklerin bakterilerin tanımlanmasında kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır. 16S ribozomal RNA analizleri ile tanımlama pek çok laboratuvarda yapılmaktadır. Karşılaştırmalı DNA dizi analizi mikrobiyel tanımlamada bugün için bilinen en iyi genotipik yöntemlerden biridir. En yaygın olan uygulama 16S ribozomal RNA geninin 500 baz çiftlik bir bölümünün ya da tümünün PCR ile çoğaltılması ve DNA dizi analizinin yapılmasıdır. Elde edilen sonuçlar onaylanmış mikrobiyel dizileri içeren veri tabanlarındaki diziler ile karşılaştırılır ve tanımlama tamamlanır.

İmmun akış prensibi ile çalışan tanımlama kitleri ile temel patojenlerin varlığı selektif zenginleştirme sonrasında 35-40 dk içinde belirlenebilmektedir. Bu kitlerle yarı kantitatif olarak toksin testleri de yapılabilmektedir.

Biyosensörler ile ilgili çalışmalara son zamanlarda sıklıkla rastlanmaktadır, ancak günlük analizlerde kullanımı yaygın değildir.

Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), tanımlama konusunda giderek önem kazanmaktadır.

Son yıllarda geliştirilmiş en önemli hızlı uygulamalardan birisi, floresan boyama esaslı uygulamalardır. Membran filtreden geçirilebilen gıdalar için giderek yaygın bir kullanım alanı bulmaktadır. Membran filtrasyon sonrası filtre, amaca uygun bir besiyerinde standart inkübasyon süresinin yarısı sürede inkübe edilir. Sonra filtre, özel floresan boya ile ıslatılmış ped içeren Petri kutusuna aktarılıp hedef mikroorganizma için gerekli sıcaklıkta 30 dk inkübasyona bırakılır ve ardından özel cihaza (örneğin, Merck Millipore EZ Fluo) alınarak incelenir.

Floresan ışıma yoksa hedef mikroorganizmanın analiz edilen numunede "var olmadığına" karar verilir ve ürün pazara verilir. Bu uygulama, gazlı meşrubat gibi steril/ sterile yakın gıdalarda stok maliyetlerini ciddi şekilde azaltır.

Yöntemin en büyük avantajı floresan boya ile boyanmış filtrede eğer mikroorganizma varsa mikroorganizmanın bu boyama işleminden zarar görmemesidir. Özel cihaz ile yapılan inceleme sonunda floresan ışıma görülürse filtre aynı uygun besiyerine aktarılarak inkübasyona devam edilir ve oluşan kolonilerin tanımlamasına standart yöntemle devam edilir.

Bugün için uygulamanın en büyük dezavantajı ise floresan boyamada familya/ cins ya da tür bazında özgüllüğün olmamasıdır. Basit bir örnekle, analiz edilen numunede koliform bakteri olmaması isteniyor ise filtre VRB Agar besiyerine yerleştirilir. Ancak koliform grup olmayan diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri de VRB Agar besiyerinde gelişerek boyama sonrasında floresan ışıma verirler. Bu durumda, sistemin hızlı analiz özelliği kalmaz çünkü henüz çıplak gözle koloni morfolojisi görülemeyen, ancak floresan ışıma veren mikrokoloninin koliform grup mu yoksa koliform grup dışında bir *Enterobacteriaceae* üyesi mi olduğu anlaşılamaz. Bunu anlamak için filtre VRB agarda standart 18-24 saat inkübasyon süresi tamamlanıncaya kadar inkübasyona devam edilmelidir. Yukarıda belirtildiği gibi filtre üzerindeki mikroorganizma floresan boyamadan olumsuz etkilenmez.

Bu sistem, yukarıda açıklanan DEFT yöntemine kıyasla geliştirilmeye çok daha açıktır. En azından bu kitabın yazıldığı tarihte pazara sunulmuş şekli ile analiz edilen numunede 0 adet *Enterobacteriaceae* ve devamında 0 adet toplam mezofilik aerop bakteri ve belki de çok daha önemli olarak 0 adet maya-küf olması beklenen gıda analizlerinde yeteri kadar tatmin edici sonuç vermektedir. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarında Merck Millipore EZ Fluo sistemi ile yapılan denemelerde *Aspergillus brasiliensis* (eski adı *Aspergillus niger*) ile 20 saat inkübasyon sonunda pozitif sinyal alınmış olması oldukça dikkat çekicidir (bknz⇒ 08.06. bölüm: Membran Filtrasyon/ Floresan Boyama Entegrasyonu).

07.04. Numune Alma

Gıdalardan mikrobiyolojik analiz için numune almak ve bunu "numune alındığı andaki mikrobiyolojik durumunu tümüyle koruyarak" laboratuvara getirmek oldukça zordur. Numunenin hangi miktarda ve kaç adet alınacağı, laboratuvara nasıl getirileceği, nasıl açılacağı ve ekim için nasıl hazırlanacağı gibi konular üzerinde titizlikle durulmalıdır.

07.04.01. Numune Miktarı

Pek çok ulusal ve uluslararası standart, analiz edilecek gıda miktarını 10 g(mL) olarak verir. Bu değer, sadece sayım yapılacak analizler için geçerlidir. Laboratuvar tipi blender ve hatta stomacher kullanımında 10 g(mL) + 90 mL homojenizasyon sıvısı, fiziksel olarak yeterli olmayabilir. Patojenler genellikle 25 g(mL) gıdada var/yok testi ile analiz edilir.

Analize alınacak numune miktarı, doğrudan gıdanın çeşidi ile de ilgilidir. Pastörize süt gibi sıvı bir gıdadan sadece 10 mL numune alınıp bunun 1 mL'si koliform analizi için VRB agara ekilebilir. Ancak örneğin, sucukta mutlaka homojenizasyon yapılmak zorundadır. Laboratuvar tipi standart bir bıçaklı karıştırıcı (blender) kullanılıyor ise 10 g sucuk + 90 mL homojenizasyon

çözeltisi yeterli değildir. Laboratuvar modeli olsa bile blender bu düşük miktarı homojenize edemez. Dolayısı ile yaygın kullanılan şekli 25 g sucuk + 225 mL homojenizasyon çözeltisidir. Stomacher kullanılıyor ise yine 25 g sucuk + 225 mL homojenizasyon çözeltisi kullanılması gereklidir.

Standart bir analizde 10 g(mL) örnek yeterli olmakla birlikte, yukarıda belirtildiği gibi özel homojenizasyon gereksinimleri uyarınca ilave her patojen testi için genellikle 25 g(mL) gıda maddesi gerekir. Buna göre, toplam aerobik mezofilik bakteri, koliform grup bakteriler, maya ve küf ile stafilokok için 10 g, *Salmonella* ve *Listeria* analizi için her birinden 25 g olmak üzere toplamda en az 60 g numunenin laboratuvara getirilmesi gerekir. Bu miktar, hiçbir hata yapılmayacağı ve dolayısı ile analizin tekrarlanmayacağı varsayımı ile geçerlidir. Böylesi bir analiz planında, hesaplanan gerekli miktarın 2 mislinin %10 fazlası numuneyi laboratuvara getirmek önerilir: Basitçe 132 ≅ 150 g(mL).

Bir gıdadan kaç adet numune alınması gerektiği çoğu kez kavram karışıklığına neden olmaktadır. Gıda endüstrisinde yapılan günlük kontrollerde sadece 1 numune genellikle yeterlidir. İşletme isterse her partiden 2, 3, 6 gibi dilediği sayıda numune ile çalışabilir. Ancak piliç kesimhanesinde *Salmonella* aranması gibi özel uygulamalarda, işletme tarafından alınması gereken numune sayısı farklıdır. Kamu tarafından yapılan denetlemelerde analiz edilecek numune sayısı, gıda ve aranacak mikroorganizmaya göre farklılık gösterebilmektedir. Ulusal ya da uluslararası ticarette bu sayı farklı olarak alınabilir.

Alınan numune sayısının ilgili partiyi temsil etmesi ayrı bir sorundur ve genellikle partinin ne kadar homojen olduğu ile de yakından ilişkilidir. Bir süt tankerinin altından ya da üstünden alınan numunelerde farklı mikroorganizma sayıları çıkması beklenebilir. Karkas numunelerinde, toplam aerobik koloni sayılması için numune miktarı 10 g olarak tanımlanıyorsa karkasın yüzeyinden ince bir şerit halinde alınan numune ile dar bir et sondası ile gövdenin içine doğru girilip alınan numune arasında farklı sonuçlar bulunması doğaldır. Homojen olmayan kütlelerden numune alım yöntemi ilgili talimatlarda açık bir şekilde belirtilmelidir. Pek çok ulusal ve uluslararası standartlarda bu gibi homojen olmayan kütlelerden numunenin nasıl alınması gerektiği belirtilmiştir.

Büyük ambalajlara (250 kg, 1 ton vb.) aseptik dolum yapılan salça, meyve suyu konsantresi gibi örneklerde ticari değer açısından numune alımı farklı bir şekilde yapılır. Bu uygulamada aynı dolum başlığından numune torbası olarak tanımlanan 2-3 kg ambalajlara numune alınır ve analiz bu ambalajda yapılır.

Bu gibi ayrıntılar nedeni ile özellikle gıda işletmelerinde yapılacak analizlerde alınacak numunenin partiyi ne ölçüde temsil ettiği incelenmelidir ve olabildiğince rastgele numune alınması sağlanmalıdır.

Numune alımındaki genel kurallar aşağıda özetlenmiştir:

-Çocuklar, yaşlılar, hamileler ve hastalar için hazırlanan gıdalardan daha fazla numune alınmalıdır.

-Fındık ezmesi gibi analizi sırasında homojenizasyon sorunu olan gıdalardan daha fazla miktarda numune alınmalıdır.

-Ambalaj boyutu küçüldükçe daha çok sayıda numune alınmalıdır.

-Büyük ambalajlar ile dökme ve yığın ürünlerden kompozit numuneler hazırlanmalıdır.

-Çabuk bozulabilen gıdalardan daha çok numune alınmalıdır.

-*Salmonella*, *Listeria* vb. patojen riski yüksek olan gıdalardan daha çok numune alınmalıdır.

-Alınacak numune sayısı uygulanan teknolojiye bağlıdır. Basit teknoloji uygulayan işletmelerde modern olanlara kıyasla daha çok numune alınması gerekir.

-Ürünün pazar payı ile doğru orantılı olarak numune alınmalıdır.

07.04.02. 2 ve 3 Sınıflı Planlar; n, c, m, M Kavramı

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde 2 ve 3 sınıflı planlar uygulanır. 2 sınıflı planlar genellikle sonuçları var ya da yok olarak alınan analizler için kullanılır ve dolayısı ile patojen analizlerine uygundur. n ve c olmak üzere 2 parametre vardır. Bunlardan n, analiz edilecek numune sayısını, c ise pozitif sonuç alınabilecek en fazla numune sayısını ifade eder. Örneğin bir gıdada *Salmonella* için n= 5; c= 0 şeklindeki plan, gıdadan 5 adet numune alınacağını ve analiz sonunda 5 numunede de 0 sayıda pozitif sonuç alınması gerektiğini gösterir. Bir başka gıdada bir başka bir mikroorganizma için n= 10; c= 2 şeklindeki plan, gıdadan 10 adet numune alınacağını ve analiz sonunda en fazla 2 numunede aranan mikroorganizma açısından pozitif sonuca izin verileceği anlamındadır.

İki sınıflı planlarda genellikle hijyen açısından m ile gösterilen ve mikrobiyolojik limiti gösteren bir üçüncü parametre de olabilir. Bu limit değer, c sayıdaki numunede izin verilen en yüksek sayıyı gösterir. Bu değer, yeterli kalite ile yetersiz kaliteyi ayırmak için kullanılır. Örneğin, bir gıdada n= 5; c=2 ve m= 10^2 KOB/g olarak verilmişse bu ifade şöyle okunmalıdır:

5 adet (n) gıda numunesinin bu mikroorganizma için analizi sonucunda en fazla 2 (c) adedinde en fazla 100 KOB/g (m) mikroorganizma bulunabilir. 1 adet dahi numune bu sınırı aşarsa ya da 2'den fazla numunede 100 KOB/g sayım sonucu alınır ise parti reddedilir.

Pek çok ulusal ve uluslararası kodekste analiz edilecek partiden üç sınıflı olarak tanımlanan plana göre 5 adet numune alınması istenmektedir ve analiz sonucunda elde edilecek limit değerler n, c, m, M ile gösterilir. Burada;

n: Analize alınacak numune sayısını,

c: “M” değeri taşıyabilecek en fazla numune sayısını,

m: (n - c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri,

M: "c" sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri ifade eder. Buna göre örneğin;

Mikroorganizma Grubu	n	c	m	M
Aerobik koloni sayısı (KOB/g)	5	2	$1,0x10^4$	$1,0x10^6$
E. coli (EMS/g)	5	2	<3	9
Salmonella spp.	5	0	25 gramda olmayacak	

şeklindeki bir tablonun açıklaması şöyledir:

5 (n) numunenin 2 (c) adedinde toplam aerobik koloni sayısı en çok $1,0x10^6$ KOB/g (M) ve aynı zamanda en çok 3 (n-c) üründe bu sayı $1,0x10^4$ KOB/g olabilir.

E. coli, sadece 2 numunede 9 EMS/g olabilir, ancak diğer 3 numunede sayı <3 EMS/g olmalıdır.

Salmonella ise 5 numunede de 25 g'da bulunmamalıdır.

Toplam aerobik koloni sayısı için n: 5; c: 2; m: $1,0x10^4$ ve M: $1,0x10^6$ olan 3 farklı partiden alınan 5'er numunede yapılan sayımlar aşağıdaki gibi olursa;

A	$1,0x10^6$	$1,0x10^6$	$1,0x10^4$	$1,0x10^4$	$1,0x10^4$	kabul
B	$2,0x10^6$	$1,0x10^3$	$1,0x10^3$	$1,0x10^3$	$1,0x10^3$	ret
C	$1,0x10^2$	$2,0x10^4$	$2,0x10^4$	$2,0x10^4$	$2,0x10^4$	ret

parti sırası ile kabul; ret; ret şeklinde değerlendirilir.

(A) örneğinde 2 adet $1,0x10^6$ KOB/g ve 3 adet $1,0x10^4$ KOB/g sonuç elde edilmiş ve limitler aşılmamıştır. Bu 5 numunede ortalama toplam aerobik koloni sayısı 4,80 log KOB/g olarak hesaplanabilir.

(B) örneğinde 1 adet numune $2,0x10^6$ KOB/g değeri ile limiti aşmıştır. Oysa bu 5 numunede ortalama toplam aerobik koloni sayısı 3,66 log KOB/g ile (A) örneğindekinden daha temiz görülmektedir.

(C) örneği ise toplam koloni sayısı açısından 3,84 log KOB/g ile yine (A) örneğindekinden daha temiz olsa da 4 numune $1,0x10^4$ KOB/g limitini aştığı için parti reddedilir.

Burada analiz edilen numunelerin toplam aerobik koloni sayısı ya da diğer kriterler açısından kıyaslanması yanıltıcı olur. Değerlendirilen ortalamalar değil limitlere uyulup uyulmadığıdır.

Kamu tarafından yapılan günlük gıda analizlerinde, her gıdadan 5 numune alınması ve bunların tümünün analizi pratik bir uygulama değildir. Güncel uygulamada çoğunlukla 1 numune analiz edilir ve M değeri esas alınır.

Bu durumda, yukarıda verilen C örneği de limitler içinde olarak kabul edilir, çünkü 5 numune de M değeri olan $1,0x10^6$ KOB/g değerini aşmamıştır.

Gıda işletmeleri arasında kaliteye önem verenler ise m değerlerinin altında kalmaya çalışırlar.

Analiz edilen 5 numune aynı parti ve aynı seri numarası taşıdığına göre sonuçlar makul sınırlar içinde birbirine yakın çıkmalıdır. Bununla beraber mikrobiyolojik analizlerde yukarıda verilen örnekte olduğu gibi aynı partiye ait 5 numenin mikrobiyolojik analizlerinde farklı sonuçlar alınması beklenebilir. Bu farklılığın 1-2 log olması kabul edilebilir. Bu farklılıklar, çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir:

-Üretim sırasında arka arkaya 2 ambalaj arasında farklılık olabilir. Bu durum, üretim sırasında ambalaj materyali değiştirme ve küçük arızalar gibi nedenlerden kaynaklanabilir. Standart üretimde arka arkaya 2 ambalaj arasındaki mikroorganizma yükü farklılığı önemsenmeyecek kadar azdır. Bununla beraber karkasın parçalanması, mandırada Beyaz peynir üretimi vb. gibi el ile yapılan üretimlerde söz konusu farklılık genel olarak daha yüksek olur.

-Aynı ambalajın numune alınan 2 yeri arasında farklılık olabilir. Bu durum özellikle bütün piliç, gövde et, sucuk, pizza ve Beyaz peynir gibi homojen olmayan numunelerde geçerlidir. Ürünlere göre numune alma işlemi tanımlanmıştır. Aynı ürünün farklı ambalajlarından aynı yöntemle analiz numunesi alındığında farklılık azalır.

-Aynı partiye ait ürünlerden bir kısmı depolama aşamasında nem, sıcaklık vb. gibi farklı koşullara maruz kalmış olabilir. İşletmede ürün belirli bir sıcaklığa soğutulduktan sonra soğuk depoya gidiyorsa arka arkaya 2 ambalajdaki mikrobiyolojik farlılık az olur. Ancak ürünler soğuk depoya gönderilip orada soğutuluyorsa, arka arkaya dahi olsa paletin alt ve üst sırasında yer alma, diğer paletin yerleştirilmesi için bekleme süresi, soğuk odada üfleyicilere yakın ya da uzak olma, depoya önce ya da sonra girme gibi nedenlerle ürünün soğuması için geçen süre farklı ve dolayısı ile mikroorganizma sayısı farklı olabilir. Fındık gibi ürünlerde doğal kurutma uygulamasında yığının altında kalan tanelerde yeterli kuruma olmayacak ve küflenme/ aflatoksin oluşumu daha fazla olacaktır. Dolayısı ile aynı üretim tarih ve seri numarasına sahip 2 paket arasında aflatoksin oluşmuş tane varlığı açısından farklı değerler elde edilebilir.

-Aynı partiye ait ürünlerden bir kısmı laboratuvara taşıma sırasında nem, sıcaklık vb. gibi farklı koşullara maruz kalmış olabilir. Bu, çeşitli laboratuvarlar tarafından yapılan analizlerde görülebilen bir durumdur. Seyyar tip buzluklarda yarım güne yaklaşan numune toplama işlemi sırasında gıdaların kabın dış çeperlerine yakın olanlarında sıcaklık yükselmesi ve dolayısı ile mikroorganizma sayısında artış olması beklenebilir.

-Aynı partiye ait ürünlerden bir kısmı laboratuvarda analiz için beklerken nem, sıcaklık vb. gibi farklı koşullara maruz kalmış olabilir. Laboratuvarda iş yoğunluğu, soğutucu kapasitesi vb. nedenlerle numuneler analiz için izin verilen süreden daha uzun süre ile laboratuvar sıcaklığında beklerse analizi ilk yapılan ile analizi son yapılan arasında farklılıklar olması beklenir.

-Başka laboratuvar hataları da söz konusudur. Aynı partiye ait numunelerin analizinde farklı tarihlerde hazırlanmış agarlı besiyerleri arasında yüzey kuruma farklılığı, iş yoğunluğuna bağlı olarak Drigalski spatüllerinin alkol ortamında yeterli beklememesi vb. gibi pek çok laboratuvar hatası söz konusudur.

-Aynı homojenizattan 2 paralel ekim arasında farklılıklar olabilir. Mikrobiyolojik analizlerde paralel ekim yapılmış 2 Petri kutusu arasındaki elde edilen sayım sonuçları arasında %10 kadar sapma olması kabul edilebilir. Gerçek mikroorganizma sayısı limit değerlere yakın olan numunelerde bu sapmaya bağlı olarak numune kabul ya da reddedilir. Örneğin, bir gıdada belirli bir mikroorganizma için M değerinin 1000 KOB/g olduğunu varsayalım. Gıdadaki gerçek sayı 950 KOB/g ile sınır değer içinde ise analiz sonunda basit istatistik kurallara göre analiz sonucu >1000 KOB/g olarak alınabilir ve parti reddedilebilir. Tersine olarak gıdadaki gerçek sayı 1050 KOB/g iken analiz sonucu <1000 KOB/g olarak da alınabilir. Bu nedenle gıda işletmelerinin mikrobiyolojik kalite olarak olabildiğince M, hatta m değerinden düşük düzeyleri hedeflemesi gerekir.

Yukarıda kısaca örnekleri verildiği gibi pek çok nedene bağlı olarak aynı üretim tarihi ve parti numarasına ait numunelerde farklı sonuçlar alınması beklenebilir. Temel amaç doğru analiz yapmak ve sonuçları doğru yorumlamaktır.

Elde edilen sonuçlar arasında rahatsızlık verici farklılıklar varsa bunların nedenleri üzerinde düşünülmesi gerekir. Bir diğer deyiş ile 5 numuneye ait sonuçların hepsi bireysel olarak doğru olsa da sonuçlar bütün olarak değerlendirilmelidir. Örneğin, aynı partiye ait 5 adet pastörize içme sütü numunesinde toplam aerobik koloni sayısı 150; 280; 9500; 250 ve 240 KOB/g şeklinde ise bu 5 numunenin analiz sonucunda ya da partide bir sorun olduğu düşünülmelidir.

07.04.03. Numunenin Alınması ve Laboratuvara Taşınması

Aşağıda çeşitli gıda grupları için numunelerin alınması ve laboratuvara taşınması konusunda dikkat edilmesi gereken kurallar belirtilmiştir.

07.04.03.01. Soğutulmuş ve Dondurulmuş Ürünler

Numune alınması ve laboratuvara taşınması en kritik olan gıda grubudur. Numune alındıktan sonra sıcaklığı korunarak laboratuvara getirilmelidir. Bu amaçla ürün sıcaklığını koruyacak izolasyonlu, yeterli büyüklükte ve buz torbaları ile desteklenen taşıma kapları kullanılmalı, ayrıca olabildiğince hızlı hareket edilmelidir.

Taşımanın yapıldığı aşamadaki dış ortam sıcaklığı ve taşıma süresinin analiz sonucunun doğru bir şekilde alınması açısından en önemli 2 faktör olduğu unutulmamalıdır.

Aynı gün alınan farklı sıcaklıklarda soğutulmuş ve dondurulmuş gıda numunelerinin beraberce laboratuvara getirilmesi gerekiyorsa 2 farklı taşıma kabı kullanılması gereklidir. Soğutulmuş ve dondurulmuş gıdalar aynı kapta taşınmamalıdır. Bunun nedeni, soğutulmuş gıdanın soğuk ve dondurulmuş gıdanın donmuş olarak laboratuvara getirilme gerekliliğidir. Soğutulmuş gıdada *Cl. perfringens* analizi yapılacaksa taşıma sırasında sıcaklığının düşmemesine ve özellikle donmamasına özen gösterilmelidir. Aksi halde, *Cl. perfringens* bu sıcaklıklarda zarar görür ve olduğundan daha düşük sayım sonucu ya da var/ yok testlerinde sahte negatif sonuç alınabilir.

Dondurulmuş olan gıdalar, soğutulmuşlara göre numune alınan yerden laboratuvara taşıma aşamasında daha stabil kalırlar. Ambalaj büyüklüğü ve şekli, dondurulmuş gıdanın sıcaklığı vb. faktörler, bu stabilitede önemlidir.

Soğutulmuş gıdalarda en büyük sorun, numune alındıktan sonra laboratuvara getirilinceye kadar geçen süre içinde sıcaklık artmasına bağlı olarak sayımı yapılacak mikroorganizma grubundaki sayı artışıdır.

Analizlerini dış laboratuvarda yaptırmak isteyen gıda sanayisi kuruluşları da taşıma kurallarına uymalıdırlar.

Laboratuvar iş yoğunluğuna bağlı olarak numunelerin analizinde sorun çıkabileceğine yukarıda değinilmiştir. Buna göre laboratuvarda mutlak olarak yeterli kapasitede soğutucu ve/veya dondurucu bulunmalıdır. Laboratuvara yığın halinde gelen numuneler, önceden belirlenen bir analiz programı uyarınca soğutucuya ya da dondurucuya aktarılmalıdır.

Prensip olarak, soğutucudan çıkarılmış bir gıda numunesinin analizi 30 dk içinde tümüyle bitirilmiş olmalıdır. Bu süreye homojenizasyon/ seyreltme ve ekim dâhildir. Yeteri ölçüde deneyimli bir laboratuvar personeli, 20 dk içinde sadece 1 adet numunenin komple mikrobiyolojik analizini (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 aranması ile toplam aerobik koloni, koliform grup ve *E. coli* biyotip 1[5], *Staph. aureus* ve maya-küf sayımı) tamamlayabilir.

Burada verilen 20 dk sadece analiz süresidir. Analizde kullanılacak numune ile homojenizasyon/ seyreltme amaçlı erlen/ kavanoz/ tüpler ve Petri kutularının tezgâha yerleştirilmesi, erlen/ kavanoz/ tüpler ve Petri kutularına gereken bilgilerin yazılması, ekimi yapılmış besiyerlerinin inkübatör(ler)e kaldırılması için 15 dk ve bir önceki analiz sonuçlarının değerlendirilmesi için 15 dk zaman ayrılmalıdır. Buna göre deneyimli bir laboratuvar personelinin komple mikrobiyolojik analiz yapması için toplam 50 dk süreye gerek vardır. Analizi yapılacak gıda numunesinde sadece koliform grup ve *E. coli* biyotip 1 analizi yapılacak ise bu sürenin değişeceği kuşkusuzdur. Kullanılmış malzemenin otoklavlanması, yıkanması ve yeni besiyeri hazırlanması için gereken süreler ayrıca hesaplanmalıdır.

[5] Standart analizde aranan *E. coli*, biyotip 1 olarak tanımlanan serotipleri ifade eder. *E. coli* biyotip 2 olanların biyotip 1'den farkı, indol negatif olmalarıdır.

Buna göre, soğutucudan sadece 1 numunenin çıkarılıp tüm ekim ve inkübatöre yerleştirme işlemleri tamamlandıktan sonra ikinci örneğe geçilmesine uygun bir laboratuvar zamanlama planı yapılmalıdır.

Dondurulmuş numunelerin analizinde her şeyden önce numunenin çözündürme işlemi vardır. Pek çok ulusal/ uluslararası standart çözündürme işleminin buzdolabı sıcaklığında (5±3 ºC) yapılmasını önerir. Bir diğer seçenek hızlı çözündürmedir. Vanilyalı dondurma örneğinde olduğu gibi küçük ambalajlı gıda numuneleri 28-30 ºC inkübatörde tutularak 30 dakikadan daha kısa bir süre içinde tümüyle çözündürülebilir. Her koşulda dondurulmuş numunenin analiz öncesi çözündürme şekli, laboratuvar kayıtlarına gereken ayrıntı ile kaydedilmelidir.

07.04.03.02. Soğutulmamış Gıdalar

Yemek fabrikaları/ otel mutfakları/ lokantalar vb. birimlerde servise sunulan ya da hazırlanan yemeklerin mikrobiyolojik analizi, üretimden hemen sonra yapılmak istenirse bu analizlerin sadece ilgili işletme laboratuvarında yapılabileceği açıktır. Bu gibi endüstriyel mutfakların çok azında yeterli kalite ve kapasitede laboratuvar vardır. Eğer analiz işletme laboratuvarında yapılacak ise çok hızlı hareket edilmesi gereği açıktır. Genel bir prensip olarak, en geç 20 dk içinde numune mikrobiyolojik analize alınmalıdır. Pastörize süt işletmeleri gibi gıda sanayisi işletmelerinde, üretim partisini temsil edecek numuneler de ilave soğutmaya gerek duyulmadan yine en geç 20 dk içinde analize alınabilir.

07.04.03.03. Düşük Su Aktivitesine Sahip Gıdalar

Yarı ya da tam kurutulmuş meyve ve sebzeler gibi gıdaların analiz için laboratuvara getirilmesi ve analiz öncesi bekleme koşulları soğutulmuş ve dondurulmuş gıdalara kıyasla çok daha kolaydır.

Bu gibi gıdalarda sadece aşırı dış ortam nemi olan mevsimlerde ve/veya bölgelerde analiz öncesi uzun süreli beklemelerde küçük sorunlar çıkabilir.

Sorun genellikle küf sayımında görülür. Örneğin, özellikle sahil bölgelerinde 10-20 km gibi kısa sayılabilecek uzaklıklarda ekolojik olarak nem çok değişken olabilmektedir. Gıdanın pazarlandığı yer ile analizin yapıldığı laboratuvarın dış ortam nemi mikroorganizma gelişmesi açısından çok farklı olabilir.

Bunların dışında fiziki yerleşim açısından hatalı olarak agarlı besiyeri eritmek için kullanılan kaynar su banyoları, yıkama işlemleri, buharı dış ortama veren eski tip otoklavların bulunduğu ıslak alanlar ile analizlerin yapıldığı kuru alanların iç içe bulunduğu laboratuvarlara sıklıkla rastlanmaktadır. Böylesi bir fiziksel laboratuvar ortamında, genellikle stabil olarak kabul edilen düşük su aktiviteli ve nem geçirmez ambalajı olmayan gıdalar, 24 saat ve daha uzun süre depolanırsa başta maya ve küf olmak üzere mikrobiyolojik analizlerde hatalı sonuçlar (gerçekte olduğundan daha fazla sayım sonucu) alınabilir.

07.04.03.04. Stabil Gıdalar

Orijinal ambalajında korunmak kaydı ile sterilize edilmiş sebze konserveleri, UHT süt, makarna, bisküvi, reçeller, meyve suları ve gazlı meşrubat gibi pastörize edilmiş düşük asitli (<4,5 pH) gıdalar, turşular, kahvaltılık çerezler, çeşitli unlar vb. gibi pazarlama birimlerinin soğutmalı olmayan raflarında pazarlanan gıdalar, mikrobiyolojik olarak stabil kabul edilir.

Bu gibi gıdaların satış birimlerinden laboratuvara taşınması ve/veya laboratuvar ortamında analiz için beklerken özel bir uygulamaya gerek yoktur. Bununla beraber, bu gibi gıdaların da doğrudan güneş almayacak şekilde, tercihen serin ve kuru bir alanda depolanması gerekir.

07.04.03.05. Numunenin Laboratuvara Kabulü

Öncelikle laboratuvar tarafından analize alınmak üzere numunenin kabulü yapılmalıdır. Bu kabul için laboratuvar personeli numunenin laboratuvara gereken koşullarda getirilip getirilmediğini kontrol etmeli, eğer standart koşullarda getirildiğine emin olursa numuneyi analiz için kabul etmeli, aksi halde ya kabul etmemeli ya da kabul formuna bununla ilgili tüm olumsuzlukları yazmalıdır.

Gerek kamu kontrol kuruluşlarının gerek gıda endüstrisindeki bir mikrobiyolojik analiz laboratuvarının gerekse özel bir gıda analiz laboratuvarının analiz için getirilen numuneyi kabul etmeme hakkı vardır.

Laboratuvara gelen ve kabul edilen numune için kabul tarihi, kabul saati, ürün ile ilgili tüm bilgiler (üretim tarihi, ambalaj özellikleri, parti numarası, vardiya numarası, numunenin alındığı saat, gerekli ise numune alım sıcaklığı, laboratuvara giriş sıcaklığı vb.) kayda alınmalıdır.

Bombaj yapmış ambalajlar açılırken laboratuvar kazasına karşı dikkatli olunmalı ve açım sırasında personel zarar görmemelidir. Sağlam bir torba içine konulan bombajlı numune, eldiven giyilmek ve diğer kişisel güvenlik önlemleri alınmış olmak kaydı ile torbaya el sokularak açılır. Bu şekilde, eğer patlama olursa laboratuvarın kontaminasyonu önlenmiş olur. Laboratuvarın bombaj nedeni ile önceden patlamış, sızıntı olmuş numuneyi kabul etmeme hakkı vardır ya da bu durum raporda belirtilir.

Sıcaklık ölçümü yapılacak ise önceden soğutulmuş termometre kullanılmalıdır. Önceden soğutma, elektronik ve dijital termometreler için gerekli değildir.

Eğer kimyasal testler de yapılacak ise öncelikle mikrobiyolojik analiz için alt numune ayrılmalıdır.

07.04.04. Laboratuvar Numunesinin Hazırlanması

Laboratuvara getirilen gıda maddesinden çoğu defa 10 g(mL) ya da 25 g(mL) alt numune alınarak mikrobiyolojik açıdan analiz edilir. Suların mikrobiyolojik analizinde sıklıkla 250 mL, hatta 5 L gibi değerlere de rastlanmaktadır. Gıda numunesinden laboratuvar numunesi hazırlanması için ambalajın açılması sırasında ambalajın dış yüzeyinden mikrobiyel bulaşma olmamasına dikkat edilmeli, bu amaçla %76 (v/v) alkol ya da uygun bir diğer dezenfektanla ambalaj yüzeyi dezenfekte edilmelidir. Bunsen beki de aynı amaçla kullanılabilir. Dezenfeksiyon amacıyla kimyasal bir dezenfektan kullanıyor ise ambalaj açılmadan önce bu dezenfektan uzaklaştırılmalı ve dezenfektanın ambalaj içindeki gıdaya bulaşması önlenmelidir. Steril pamuk ya da bez, dezenfektanın uzaklaştırılması için kullanılabilir.

Açımda kullanılacak makas, konserve açacağı, şişe açacağı, bisturi vb. materyal önceden uygun bir ambalaja (kâğıt, mutfak tipi alüminyum folyo) sarılarak etüvde ya da otoklavda sterilize edilmiş olmalıdır. Sterilizasyon, alkolde bekletme ile de yapılabilir. Alkolden çıkartılan makastaki alkol, basitçe Bunsen beki alevinden geçirilerek uzaklaştırılabilir.

Tanktan numune alınırken numune musluğu yine dezenfekte edilmeli ve en az 10-15 mL sıvı dışarıya akıtıldıktan sonra steril kavanoza numune alınmalıdır.

Gıda numunesinin bileşimi laboratuvar örneğinin hazırlanmasında en önemli etkenlerden birisidir. Sıvı bir gıdanın basit olarak elle çalkalanması dahi yeterli bir homojenizasyon sağlayabilir. Tersine olarak katı gıdalarda laboratuvar örneğinin alınması ve homojenizasyon çok daha özel koşullar gerektirir.

Süt örneklerinde bu tip bir homojenizasyonun sağlanması için Food and Drug Administration (FDA) tarafından standart çalkalama şekli tarif edilmiştir. Buna göre yaklaşık 3/4 oranında dolu olan numune kapları 30 cm mesafede 7'şer sn süre ile 25 kez hareket ettirilerek çalkalanır. Son tüketici ambalajındaki sıvı gıda 25 kez baş aşağı çevrilir. Çalkalama işleminden sonra 3 dk içinde numune alınmış olmalıdır.

Bu çalkalama tanımı süt için verilmiş olmakla birlikte diğer sıvı gıdalar için de uygulanabilir ya da laboratuvar kendi standardını oluşturmalıdır.

Gıda analizlerinde katı gıdalardan laboratuvar numunesi hazırlama ve homojenizasyon, üzerinde en çok çalışılan konulardan birisidir. Basit olarak bir karabiber çuvalının altından, ortasından ya da üzerinden örnek alınması halinde bu 3 örnek arasında toplam koliform bakteri içeriği açısından büyük bir fark beklenmez. Ancak bir beyaz peynir kalıbı için durum farklıdır.

Katı gıdanın çeşidine ve hedef mikroorganizma analizine göre hazırlanmış pek çok dikey standart[6] vardır. Öncelikle bu standartlara uyulması gereklidir. Gıdanın üretim teknolojisi de bu konuda önemlidir. Örneğin, kaymaklı ve kaymaksız tip yoğurtta üretim teknolojisine bağlı olarak istenmeyen mikroorganizma analizinde farklı hazırlıklar yapılması gerekir. Aşağıda bazı tipik örnekler verilmiştir.

-Küçük ambalajda kuru gıda: En az sorunlu olan numunelerdir. Temel mikrobiyoloji kuralları gereğince steril bir kaşık ya da uygun bir çubuk ile karıştırmak ve numune almak yeterlidir.

-Büyük ambalajda kuru gıda: Ambalajın altından, ortasından ve üstünden farklı numuneler alınıp hepsi karıştırılmalı ve bu kompozit numuneden analiz numunesi alınmalıdır.

-Dondurulmuş gıdalar: Kuru gıda örneğindeki gibidir.

-Ekmek: Küfler sadece yüzeyde bulunur. Tersine olarak, rop sporu nem faktörüne bağlı olarak iç kısımlarda çimlenip çoğalır ve sünme hastalığına neden olur. Ekmek, olabildiğince ince olarak dilimlenip içi ve dışı temsil edilecek şekilde tartım yapılmalıdır.

-Gövde et: Bütün mikroorganizmalar yüzeydedir. Özel sonda ile numune alınmalıdır. Sadece yüzeyden belirli bir alanda sayım da yapılabilir.

-Salatalar: Salata hammaddeleri salata içinde homojen dağılmaz ve hammaddeler farklı mikroorganizma popülasyonu içerir. Bu durumda numune alınmadan önce salata olabildiğince karıştırılmalı ve rastgele olarak farklı yerlerinden numune alınmalıdır.

-Sucuk: Kütlenin içinde ve dışında farklı tür ve sayıda mikroorganizma görülebilir. Olabildiğince ince olarak dilimlenmeli ve tartım bu dilimler kullanılarak yapılmalıdır.

-Peynirler: Kütlenin içinde ve dışında farklı tür ve sayıda mikroorganizma görülebilir. Olanak varsa, özellikle sert peynirlerin kalıbı rendelenmeli ve tartım bu rendelenmiş kısımdan yapılmalıdır. Özel sondalar da kullanılabilir ya da çok ince olarak dilimlenmelidir.

Analiz için gelen numune, mümkün olan en kısa süre içinde analize alınmalıdır. Analiz için bir süre bekleme zorunluluğu varsa;

-Mikrobiyolojik olarak stabil olan ürünler, son kullanma tarihinden önce ve elden geldiği kadar çabuk olarak analize alınmalıdır.

-Taze ve soğutulmuş ürünler, kabulden sonra 24 saat içinde analize alınmalıdır. Daha uzun bir depolama süresi kaçınılmaz ise ürün derhal dondurulmalı ve -18 ºC'ta depolanmalıdır. Dondurma işlemi üründeki mikrobiyel

[6] Yatay (horizontal) standartlar genel ya da başka bir deyiş ile temel standartlardır. Aksine bir uyarı yoksa tüm numunelere uygulanır. Dikey (vertical) standartlar ise ürüne özgüdür ve uygulama standardı olarak da anılır.

florayı etkileyeceği için bu durum analiz raporunda açıkça belirtilmelidir. *Cl. perfringens* gibi bazı mikroorganizmalar, dondurma işleminden olumsuz etkilenir. Buna göre analiz öncesinde dondurulmuş taze ürünlerde *Cl. perfringens* analizi yapmanın gereği yoktur.

-Numunenin dondurulması zorunlu ise ve numune uygun ise olabildiğince küçük porsiyonlar (50 g'dan daha fazla olmayacak) şekilde dondurulmalıdır. Büyük porsiyonlar halindeki ürünlerin çözülmesinin küçük porsiyonlu olanlara göre daha uzun süre alacağı ve çözündürme süresi içinde psikrofil/ psikrotrof bakterilerin gelişebileceği gözden uzak tutulmamalıdır. Eğer numune önceden tartılarak dondurulduysa doğrudan homojenizasyon çözeltisine aktarılarak çözündürülebilir.

-Dondurulmuş ürün, analiz amacıyla çözündürüldü ise analiz ertelenemez.

Laboratuvara gelen ve kabul edilen numunenin paraleli, analiz bitinceye kadar ürün özellikleri değişmeyecek şekilde şahit olarak korunmalıdır.

Analiz amacı ile ambalaj açıldıktan sonra analiz, elektrik kesintisi gibi zorunlu haller dışında ertelenmemelidir. Böyle bir zorunluluk halinde analizin ertelenmesi gerekiyorsa ambalaj tekrar kapatılmamalı, analize alınacak gıda, laboratuvarda her an bulunması gereken steril bir kaba aktarılarak korunmalıdır.

Sıvı örnekler doğrudan analize alınabilir. Katı gıdalar ise tartım, homojenizasyon vb. gibi ön işlemlerden geçmek zorundadır.

Katı örneklerde belirli bir ağırlığın (10 g, 25 g vb.) tartılması aseptik koşullar altında yapılmalıdır. Dikey tip ekim kabini içinde tartım yapılması en sağlıklı yöntemdir. Tartımın yapılacağı kap, önceden sterilize edilmiş, seyreltme veya *Salmonella* analizinde olduğu gibi ön zenginleştirme besiyerini rahatlıkla alabilecek boyutta olmalıdır.

Katı gıda maddesi tartım sırasında sorun çıkaracak büyüklükte ve nitelikte parçalardan oluşuyor ise tartımdan önce uygun boyutlara parçalanmalıdır.

Terazi üzerine gereksiz ağırlık konulması kalibrasyonu bozar. İstenilen ağırlıktan daha fazla parça aktarıldı ise bunun geri alınmasında zorluk olabilir. Bu nedenle tartımlar, prensip olarak erlen veya beher gibi kaplara değil steril saat camı, steril Petri kutusu veya steril alüminyum folyo gibi materyalde yapılıp tartılmış numune daha sonra içinde besiyeri olan erlene, blendere ya da stomachere alınmalıdır.

Tartım sırasında, numunenin hedeflenen ağırlığa kesin olarak getirilmesini sağlamak amacı ile kontaminasyon riskini artıracak düzeyde uğraşılmamalıdır. Bu konuda deneyim önemlidir. Bazı gıdaların (örneğin parça et) önceden küçültülmüş olsa da tam olarak 10,0 g tartılması hayli zordur. Böyle durumlarda tartım hatası seyreltme sıvısı miktarının değiştirilmesi ile ortadan kaldırılır. Standart çalışmada 10 g gıda üzerine 90 mL seyreltme sıvısı konulmalıdır.

Tartım sonucunda, gıda 10,5 g olarak tartıldı ise seyreltme sıvısı 90 mL yerine 94,5 mL olarak alınır (10,5 x 9= 94,5) ve yine standart 1:10 oranı elde edilir. 90 mL olarak hazırlanmış seyreltme sıvısının üzerine laboratuvarda yedek olarak tutulan steril seyreltme sıvısından pipet ile 4,5 mL eklemek gıdayı tam olarak 10,0 g olarak tartmaktan çok daha kolay ve hızlıdır. Ayrıca tartım sırasında kontaminasyon olasılığı azaltılmış olur.

Bu uygulamanın hedeflenen ağırlıktan daha fazla tartımlar için geçerli olduğu ve elden geldiğince %5'ten daha fazla tartım yapılmaması gerektiği unutulmamalıdır. *Salmonella* vb. mikroorganizmaların var/yok testlerinde 25 g yerine 26 g tartıldı ise 225 mL ön zenginleştirme besiyeri kullanmak yerine 234 (= 225 + 9) mL besiyeri kullanmak zorunlu koşul değildir. Çünkü burada yapılan 25 g gıda + 225 mL besiyeri kullanımı bir seyreltme değil, genel olarak her 1 g gıda için 9 mL besiyeri kullanılmasıdır. Bu konuda ±%5 tolerans her zaman kabul edilir. Bu örnekteki sapma sadece %4'tür.

ISO 6887 sayılı standart serisi, Türk Standartları Enstitüsü'nden sağlanmalı ve Türkçe kaynak olarak laboratuvarda bulundurulmalıdır. Benzer şekilde, başta FDA olmak üzere pek çok uluslararası standarda erişilebilir.

07.05. Homojenizasyon ve Seyreltme

Homojenizasyon, katı ve yarı katı gıdaların amaca uygun bir çözelti içinde homojen hale getirilme işlemidir. Sıvı gıdalar zaten homojen bir dağılım gösterir. Burada homojenlikten kasıt, gıdadaki mikroorganizmaların analiz yapılacak tüm kütleye homojen olarak dağıtılmasıdır. Mikrobiyolojide homojenizasyon denildiğinde analize alınacak numunenin tüm kitleyi temsil etmesi yanında özellikle katı gıdaların sıvılaştırılması da anlaşılır. Bir diğer deyiş ile katı gıda, agarlı bir besiyerine doğrudan ekilemeyeceği için belirli bir sıvı içinde çözülür. Bu işlem de homojenizasyon olarak anılır.

Analize alınacak gıda numunesi, olabildiğince homojen olmalıdır. Basit olarak, kaymaklı yoğurdun kaymağının altındaki bölgeden numune alındığında yoğurttaki yağ miktarının %0'a yakın çıkacağı kuşkusuzdur. Buna göre kaymaklı yoğurtta yağ analizi yapılacak ise öncelikle kaymak, tüm kitleye homojen bir şekilde dağıtılmalıdır. Benzer kurallar mikrobiyolojik analizler için de geçerlidir.

Tuz ve şeker gibi katı gıdalar su içinde kolaylıkla çözülebilir. Bu gibi numuneleri el ile karıştırmak dahi yeterli bir homojenizasyon sağlar. Yoğurdun, erleni elle karıştırarak suda çözülmesi çok uzun zaman alır. İçinde manyetik taş (balık) olan homojenizasyon çözeltisi ve manyetik karıştırıcı ile yoğurt kolaylıkla homojenize edilebilir. Sucuk gibi gıdalar için mutlaka homojenizatör kullanılması gerekir. Sucuğun homojenizasyonunda stomacher ya da blender kullanılmalıdır.

Tereyağı homojenizasyonunda kullanılan çözeltiler 30-32 ºC'ta olmalıdır. Pipetleme sırasında pipetin içinde tereyağının katılaşmasını önlemek için cam pipet birkaç kez alevden geçirilerek ısıtılır.

Homojenizasyon (ilk seyreltme) ve sonraki seyreltmeler standart olarak 1:9 oranında yapılır. Bunun için başlangıçta 10 g gıda numunesi 90 mL seyreltme çözeltisi ile homojenize edilir. *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 serotipi ve *Listeria* analizinde ise 25 g gıda 225 mL besiyerine ilave edilir.

Un, nişasta, hazır çorba ve kuru maydanoz gibi gıdalar, 1:9 oranında homojenize edilemez. Bu oranda işlem yapıldığında un ve hazır çorba pıhtılaşır, kuru maydanoz mevcut suyu tutar. Bu nedenle ilk seyreltme 1:19 oranında yapılır.

Eğer analiz edilecek gıdada beklenen hedef mikroorganizma sayısı düşük ve buna bağlı olarak sağlıklı bir sayım alınamayacak ise ve gıda maddesi homojenizasyon sıvısında kolaylıkla çözülebiliyorsa 1:4 oranı ile de homojenizasyon yapılabilir. Örneğin 10 g toz şeker numunesi, 40 mL homojenizasyon çözeltisi içinde homojenize edilebilir.

07.05.01. Homojenizatörler

En yaygın kullanılanları "blender" ve "stomacher"dır. Analiz edilecek gıdaya ve laboratuvar olanaklarına göre blender ya da stomacher kullanılmalıdır.

07.05.01.01. Blender

Blender, mutfak tiplerinde olduğu gibi dönen bıçakları ile katı gıdayı kullanılan çözelti içinde homojen hale getirir.

Her ne kadar laboratuvarda ev tipi blender kullanmak mümkünse de bunların alkol ile yapılan sterilizasyonlarına özen gösterilmesi gerekir. Plastik gövdeden alkolün uzaklaştırılması steril su ile çalkalayarak yapılır. Plastik gövde için alev ile alkol uzaklaştırması yapılmamalıdır. Laboratuvar tipi paslanmaz çelik gövdeli bazı blenderlerin kapakları çoğunlukla plastik olup sadece alkol ile sterilize edilebilir.

Blender kullanılmasında hız ve süre önemlidir. Mikroorganizmaya zarar vermemek için olabildiğince düşük hız ama gerekli ise uzun süreli homojenizasyon yapılmalıdır.

Anaeropların analizinde blender kullanılmaz. İşlem sırasında oluşan anafor nedeni ile bol miktarda hava (oksijen) ile temas edecekleri için sahte negatif ya da olduğundan daha düşük sayılarda sonuç alınır. *Cl. perfringens* aerotolerant olmakla birlikte anafor olacak kadar fazla oksijen varlığında zarar görür.

Blender kullanımında ilave 250 mL boş bir steril erlen bulundurulmalı, 25 g gıda ile seyreltme sıvısından 150 mL kadar kısım blenderde homojenize edilip boş

steril erlene aktarılmalı, seyreltme sıvısından arta kalan kısım ile blender çalkalanmalı ve erlene ilave edilmelidir.

07.05.01.02. Stomacher

Stomacher, özel torbaları içindeki pedalları sayesinde bir anlamda gıdayı ezerek homojenizasyon sağlar. Adını midedekine benzer öğütmeden alır (stomach= mide). 1960'lı yıllarda başlayan mikrobiyoloji laboratuvarı otomasyonunda ilk ciddi gelişme olarak kabul edilir. Basit olarak basınca dirençli özel torbaya gıda ile homojenizasyonda kullanılan sıvı konulur. 2 pedal aracılığı ile sıkıştırarak homojenizasyon sağlar.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Filtreli tip torbaların kullanılması analizde büyük kolaylık sağlamaktadır.

07.05.01.03. Diğer Homojenizatörler

Kullanım amacına göre manyetik karıştırıcı ve mutfak tipi el mikserleri de homojenizasyon amacı ile kullanılmaktadır. Peynir rendesi ve havan içinde kum ile ezme işlemleri de yeterli bir homojenizasyon sağlayabilmektedir. Rendelenmiş yumuşak peynirler doğrudan erlene ilave edilerek manyetik karıştırıcıda homojenizasyon sağlanabilir, ancak sert peynirlerde bu uygulama yeterli olmaz.

Ketçap ve yoğurt gibi yarı katı gıdaların analizinde homojenizatör olarak manyetik karıştırıcı da kullanılabilir. Bu amaçla homojenizasyon çözeltisi içinde yeterli büyüklükte manyetik taş ile sterilize edilir.

07.05.02. Homojenizasyonda Kullanılan Çözeltiler

Homojenizasyon, aynı zamanda 10^{-1} seyreltme olduğu için prensip olarak seyreltmede bu amaca uygun çözeltiler kullanılır.

Genel amaçlı seyreltme çözeltisi olarak "serum fizyolojik" (%0,85 NaCl) yaygın kullanım alanı bulmuşsa da bugün ISO 6887'ye göre formülü serum fizyolojik (%0,85) + pepton (%0,1) olan "maximum recovery diluent; MRD" kullanılmaktadır. Bu çözelti, "pepton-tuz (saline-peptone)" olarak da anılmaktadır. Yine ISO 6887'ye göre %0,1 pepton çözeltisi ile *Salmonella* analizinde kullanılan "tamponlanmış peptonlu su", seyreltme amacı ile kullanılmaktadır.

Başta peynirler olmak üzere süt ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde seyreltme sıvısı olarak ¼ kuvvetinde Ringer çözeltisi kullanılmalıdır. Süt ürünleri dışında Ringer çözeltisi kullanmak gerekli değildir. Peynirlerde homojenizasyon amacıyla %2 sodyum sitrat çözeltisi kullanılabilir.

Reçel, meyve suyu konsantresi gibi yüksek şekerli gıdalardaki ozmofilik/ ozmotolerant mayaların sayımında %20 glikoz çözeltisi ilk ve daha sonraki seyreltmelerde kullanılır. Anaeropların analizinde oksijeni bağlayan özel

seyreltme çözeltisi kullanılması gerekmektedir. Halofil bakteriler (*Vibrio* türleri vb.) gibi özel grupların analizinde de özel seyreltme çözeltiler kullanılmaktadır.

Yağ oranı yüksek gıdaların homojenizasyonu için Tween 80 kullanılabilir. Bu amaçla seyreltme sıvısı içine sterilizasyon öncesinde %0,1-1,0 oranında Tween 80 katılması, özellikle krema gibi çok yağlı süt ürünleri için önerilmektedir. İlave edilecek Tween 80 miktarı, numunedeki yağ oranı ile ilgilidir. Örneğin, %30 yağlı bir ürün için pratik olarak %0,3 Tween 80 eklenir.

Benzer şekilde, mayonez için Triton x100'ün %1'lik çözeltisinden 90 mL'ye 1 mL ilavesi ile daha iyi bir homojenizasyon sağlanmaktadır. Yağlı gıdaların analizinde Triton x100 kullanılması çeşitli uluslararası standartlarda geçmektedir. Bu çözeltilerin dışında daha pek çok çözelti de özel amaçlarla kullanılabilmektedir.

Seyreltme çözeltileri her 6 ayda bir olmak üzere toksik maddelerin varlığı açısından kontrol edilmelidir. Basit olarak sayım sonucunun sağlıklı olarak alınacağı (yaklaşık 100 KOB/ Petri kutusu) seyreltiden, seyreltme yapıldıktan 0; 15; 30 ve 45 dk sonra tercihen PCA'ya ekim yapılır. Bu amaçla çiğ süt kullanılabilir ve gerekirse birden fazla seyreltiden ekim yapılabilir. Eğer, 45. dk sayımları 0. dk sayımlarına oranla %20'den daha az ise bunun nedeni saptanıp düzeltici işlem uygulanır ve tekrar test edilir. Bununla ilgili kayıtlar tutulmalıdır.

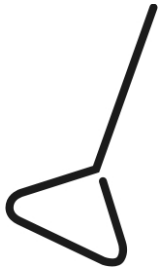
Kuru gıdalarda erimeyi kolaylaştırmak için ilk seyreltmenin yapılacağı erlene sterilizasyon öncesinde yaklaşık 6 mm çaplı cam boncuk atılması önerilmektedir. Cam boncuk kullanılması hardal, fındık ezmesi ürünleri, krema vb. gibi kolay erimeyen gıdalar için de önerilir.

Yine kuru gıdaların homojenizasyonunda özellikle Gram negatif bakterileri ozmotik şoktan korumak için kademeli homojenizasyon önerilmektedir. Bu amaçla steril bir erlene 10 g numune alınıp üzerine 10 mL kadar seyreltme çözeltisi ilave edilir ve elle karıştırılarak yeterli ıslanma sağlanır. Sonra seyreltme çözeltisinin kalan kısmı ilave edilir ve homojenizasyon tamamlanır.

07.05.03. Seyreltme

Bir sıvı gıdada 1000 KOB/mL *E. coli* olduğunu varsayalım. Buradan 0,1 mL alınıp içinde önceden dökülmüş uygun bir katı besiyeri olan Petri kutusuna aktarılır ve Drigalski spatülü (Şekil 07.05) ile yüzeye yayılır ve inkübasyona bırakılır ise inkübasyondan sonra çok yaklaşık 100 koloni sayılabilir.

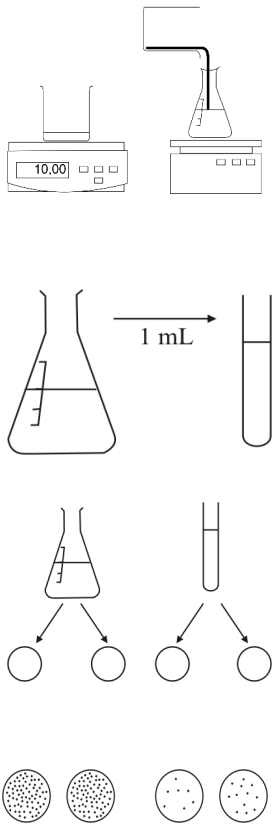
Drigalski spatülü, cam ya da metal olabilir. Alkol ile sterilize edilebileceği gibi etüvde ya da otoklavda sterilize edilebilir. Tek kullanımlık plastik steril spatüller de vardır.



Şekil 07.05.
Drigalski Spatülü

Yoğun mikrobiyolojik analizlerde %76'lık alkol olan beher içinde 4-5 Drigalski spatülü bulundurulur. Kullanılmış spatül en arkaya yerleştirilir, yeni yayma işlemi için en öndeki spatül alınır. Böylece her spatül alkol içinde yeteri kadar uzun süre kalmış olur.

Petri kutusunda 100 koloninin sayılması kolaydır. Aynı sıvı gıdada 10^4 KOB/mL bakteri varsa buradan yapılacak 0,1 mL ekim ve inkübasyon sonrasında Petri kutusunda ~1000 koloni meydana gelecektir ve bunun sayılması mümkün değildir. Bu sıvı gıdadan 1 mL alınıp içinde 9 mL steril uygun bir seyreltme çözeltisi olan tüpe aktarılacak olursa sayı 10 kez azalmış (seyrelmiş) olur. Seyreltme işlemi şematik olarak Şekil 07.06'da verilmiştir.



10 g gıda numunesi, 90 mL seyreltme çözeltisi içinde homojenize edilir. Gıdanın her gramında "A" sayıda bakteri olduğu kabul edilirse 10 g gıda ile erlene "10A" sayıda bakteri gelmiştir. 90 g (mL) seyreltme çözeltisi ile birlikte toplam miktar 100 g (mL) olur, ancak seyreltme sıvısı steril olduğu için buradan bakteri gelmez. Sonuçta toplam 100 g çözeltide yine "10A" sayıda bakteri vardır. Dolayısı ile bunun 1 mL'sinde bulunan bakteri sayısı 10A/100= 0,1A olacaktır. Erlendeki çözelti orijinal örneğe göre 10 kez seyreltilmiştir ve 10^{-1} olarak ifade edilir.

İşlem, bu çözeltiden 1 mL alınıp 9 mL seyreltme çözeltisi olan tüpe aktarım ile devam eder. Aynı şekilde tüpteki bakteri sayısı erlene göre 10, orijinal numuneye göre 100 kez seyrelmiş olur ve tüpün her mL'sinde 0,01A bakteri vardır. 10^{-2} olarak gösterilir.

Erlendeki ve tüpteki seyreltilerden ayrı ayrı olmak üzere dökme yöntemiyle Petri kutularına 1'er mL aktarılır. Petri kutularına geçen bakteri sayısı sırası ile 0,1A ve 0,01A şeklindedir. Bir diğer deyiş ile Petri kutularına sırası ile 0,1 g ve 0,01 g gıda maddesi aktarılmış olur. Standart uygulamada her seyreltiden ikişer Petri kutusuna ekim yapılır ve Petri kutuları inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon sonunda erlenden yapılan ekimde Petri kutularındaki koloni sayısı tüptekinin 10 misli fazladır. Koloniler sayılarak gıdadaki bakteri sayısı hesaplanır (bknz ⇒ 08.01. Bölüm).

Şekil 07.06. Seyreltme

Seyreltmenin 1:9 oranında yapılmasının nedeni hesap kolaylığı içindir. Petri kutusunda sayılan koloni basit olarak seyreltme faktörü ile çarpılır. Bu faktör, 1:9 oranı kullanıldığında 10, 100, 1000 gibi bir değerdir. 1:99 oranında seyreltme kullanılarak doğrudan 100 kez seyreltme de yapılabilir.

Amaca uygun olarak katı gıdada homojenizasyon yani başlangıç seyreltmesi 1:4 veya 1:19 ya da başka bir oran ile de yapılabilir.

Örnek: Unda toplam mezofil aerop koloni sayımı için ilk seyreltme 1:19 oranında yapılmış, bu kısım sanki ayrı bir sıvı gıda numunesi gibi düşünülüp buradan standart 1:9 oranında seyreltme yapılmış ve ardından yayma yöntemi ile ekim ve inkübasyon sonunda 10^{-2} seyreltide 219 ve 205, 10^{-3} seyreltide 23 ve 18 koloni sayılmıştır. Yukarıdaki örneğe göre, "ayrı bir örnek olarak düşünülen" un çözeltisinde bulunan bakteri sayısı $2{,}1 \times 10^5$ KOB/mL'dir. Bu değer 20 ile çarpılarak un örneğinde $4{,}2 \times 10^6$ KOB/g bakteri olduğu hesaplanır. Hesaplama yöntemi, 08.01. Bölümde verilmiştir. EMS yönteminde de aynı yaklaşım söz konusudur (bknz ⇒ 08.02. Bölüm).

Örnek: 10 g toz şeker numunesi, 40 mL homojenizasyon çözeltisi ile homojenize edilmiş, homojenizattan dökme yöntemi ile 1 mL ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda Petri kutusunda 60 KOB değeri elde edilmiştir. Bu değer orijinal numuneye göre 5 kez seyreltilmiş olan homojenizattaki sayıdır. 5 ile çarpılarak toz şeker numunesinde 300 KOB/g sonucu hesaplanır.

07.06. Ekim ve İnkübasyon

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

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

07.06.01. Ekim Yöntemleri

Bir gıda numunesinde mikroorganizma sayımı için farklı ekim yöntemleri kullanılabilir. Bunların başlıcaları katı besiyeri kullanılan yöntemler (dökme, yayma, damlatma), sıvı besiyeri kullanılan yöntemler (EMS) ve membran filtrasyon yöntemidir. Bunların dışında mikrotiter vb. yöntemler, metabolizmaya dayalı sayımlar, mikroskobik sayımlar gibi başka sayım yöntemleri de vardır ve bunlar ile ilgili ayrıntılı bilgiler 08. Bölümde verilmiştir.

Bu bölümde bu yöntemler hakkında kısaca bilgi verilmiş ve özellikle katı besiyerlerine ekimde kullanılacak analiz yöntemi ve seyrelti seçimi üzerinde durulmuştur.

Katı besiyeri kullanılan standart bir mikrobiyolojik analizde sayımın prensibi "her canlı mikroorganizma hücresinin uygun bir katı besiyerinde uygun bir inkübasyon sıcaklık ve süresi sonunda 1 adet koloni oluşturmasıdır". Bununla birlikte canlı olduğu halde hasar görmüş ve gelişip koloni oluşturamayacak canlı hücreler de gıda maddesinde bulunabilir. Canlı olduğu halde hasar görmüş ve koloni oluşturamayan hücreler, "canlı fakat kültürü yapılamayan (Viable but non-culturable; VBNC)" olarak tanımlanır. Bu nedenle sayım sonuçları "sadece koloni oluşturabilenlerin" sayıldığını göstermek üzere "koloni oluşturan birim KOB (colony forming unit; CFU)" olarak verilmektedir. Canlı fakat kültürü yapılamayan hücreler, zamanla hücre hasarlarını onarıp besiyerinde koloni oluşturabilirler.

Standart mikrobiyolojik analizlerde kullanılan 9-10 cm çaplı standart boy bir Petri kutusunda inkübasyon sonrasında ideal olarak 100 koloni oluşması hedeflenir.

Basit bir yaklaşımla Petri kutusundaki koloni sayısı ne kadar düşük ise koloni çapı büyür ve sayım kolaylaşır. Ancak istatistiksel yaklaşımla elde edilen sayıya güven azalır. Tersine olarak, Petri kutusundaki koloni sayısı ne kadar yüksek ise sayım o denli zorlaşır ama istatistiksel olarak elde edilen sayıya güven o denli artar.

Bu durumda Petri kutusundaki koloni sayımı için gerek sayım kolaylığı gerek istatistiksel güven aralığı dikkate alınarak kabul edilebilir alt ve üst sınırlar olmalıdır. Farklı uluslararası kaynaklar, bu alt ve üst sınırları 30-300 olarak vermektedir. Ayrıca FDA tarafından süt ve süt ürünleri için kabul edilen limitler PCA sayımlarında 25-250, VRB Agar besiyerinde koliform grup bakteri sayımlarında 1-154 ve maya-küf sayımlarında 15-150'dir.

Her ne kadar güvenilir bir sayım sonucu elde edilmesi için Petri kutusunda oluşan koloni sayısının bir alt limiti varsa da günlük uygulamada bu alt limitin altındaki sonuçlar da kabul edilmektedir.

Örnek: Pastörize içme sütünde toplam *Enterobacteriaceae* sayısı <10 KOB/mL olmalıdır. Buna göre VRBD Agar besiyerine 0,1 mL numune aktarılır ve yayılır. 37 ^{o}C'ta 24 saat inkübasyon sonunda 0 sayıda koloni varsa parti kabul edilir. 1 adet ve üzerindeki tüm koloni sayıları partinin reddi anlamındadır. Aynı analiz 1 mL numune ile dökme yöntemi ile de yapılabilir. 9 ve daha az sayıda koloni sayılırsa parti kabul edilir.

Örnek: Bazı gıdalarda koagülaz pozitif *Staph. aureus* için 3 sınıflı plana göre verilen limitler n= 5; c= 2; m= 10^2 KOB/ g(mL) ve M= 10^3 KOB/ g(mL) şeklindedir. Homojenizasyon yapılması gereken katı gıda homojenizatından (10^{-1} seyrelti) 0,1 mL ekilip inkübasyon sonunda 1 ile 7 arasında koloni elde edilirse partinin kabulü kritiktir, çünkü m= 10^2 KOB/ g(mL) değeri aşılmıştır. Kaç adet numunede (c) bu sınırın aşıldığı önemlidir. Sayılan koloni 10'a ne kadar yakınsa risk o kadar fazladır. 10 koloni sayıldı ise sonuç 10^3 KOB/ g(mL) anlamına gelir ve bu M değeridir.

10'un üzerindeki koloni sayısı $>10^3$ KOB/ g(mL) ile M değerini geçmiştir. Burada kritik olan konu 10; 11 ve 12 gibi değerlere duyulacak güvendir. Aynı partiden bir kez daha analiz yapılırsa 8 ya da 9 koloni elde edilebileceği gibi 13 ya da 14 koloni de elde edilebilir. Bu analizde 0 adet koloni sayılırsa m= 10^2 KOB/ g(mL) değerinin altında kalındığı için standartlara uyulmuştur. Yine bu analizde 0,1 mL yayma yerine 1 mL yayma ya da 1 mL dökme kültür yöntemi ile ekim yapılmış olsa idi, analizin duyarlığı 10 misli artacağı için elde edilecek koloni sayılarına çok daha fazla güvenilecekti.

Bu aşamada, Petri kutusundaki hedeflenen koloni sayısının 100 olması ile devam edilmektedir. Katı besiyerindeki sayım ile ilgili istatistiksel güven sınırları, 08.01. Bölümde verilmiştir.

07.06.01.01. Yayma Plak Yöntemi

Mikrobiyolojide temel sayım yöntemi, katı besiyerinde yayma plaktır. Yayma plak yöntemi denildiğinde asıl olarak Petri kutusuna önceden dökülmüş ve katılaşmış besiyeri üzerine 0,1 mL'nin aktarılıp Drigalski spatülü ile yayılması anlaşılır. Bununla beraber aşağıda açıklanacağı gibi 1 mL'nin de katı besiyerine aktarılıp yayılması mümkündür. Yayma yöntemi ile ekim Şekil 07.07'de gösterilmiştir.

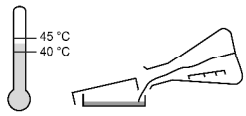
Buna göre, katı bir gıdada 10.000 KOB/g düzeyinde hedef mikroorganizma varsa 10^{-1} seyreltiden (homojenizat) 0,1 mL yayma ekim yapıldığında inkübasyon sonunda Petri kutusunda teorik olarak 100 koloni elde edilir. Bir diğer deyiş ile katı gıdada 0,1 mL yayma ekim çalışılabilmesi için alt sınır 10^4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

Yayma plak yönteminde Petri kutusuna 0,1 mL sıvı aktarılmasının nedeni hesap kolaylığıdır. 10^{-1} seyreltiden 0,1 mL ekim ve inkübasyon sonunda 63 koloni sayılırsa sonuç 63x10x10= 6300= $6,3x10^3$ KOB/mL olarak basitçe hesaplanır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında günlük analizde kullanılan standart 9 cm çaplı Petri kutularındaki agarlı besiyerlerinin çoğu daha fazla sıvıyı emme kapasitesine sahiptir.

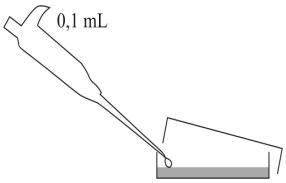
Buna bağlı olarak, 0,1 mL yerine 1 mL sıvının analizi iki farklı uygulama ile mümkündür:

-1 mL çözelti olabildiğince eşit şekilde 3 Petri kutusundaki besiyerine aktarılır ve yayılır. İnkübasyon sonunda bu üç Petri kutusu tek Petri kutusu gibi değerlendirilir.

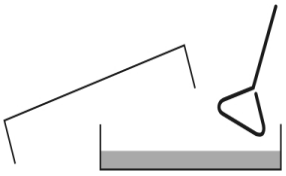
-14 cm çaplı Petri kutularına dökülmüş olan agarlı besiyerlerinde yüzey alanı 154 cm^2 olup standart 9 cm çaplı Petri kutusu yüzey alanı olan 63,6 cm^2 ile kıyaslandığında 2,42 misli daha fazla yüzey alanına sahiptir. Bu yüzey alanına sahip agarlı besiyeri yayma plak yöntemiyle yapılan analizde 1 mL sıvıyı tümüyle emer.



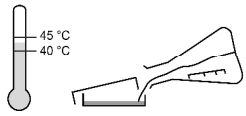
Steril Petri kutularına önce steril besiyeri en az 2 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülür (standart Petri kutuları için 12-15 mL). Besiyeri dökme sıcaklığı, 40-45 °C olmalıdır. Ekim öncesi yüzey yeterli bir şekilde kurutulmalı, aşırı nemli ya da çok kuru olmamalıdır.



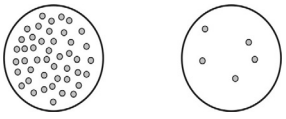
Bunun üzerine 0,1 (~0,33; 1,0) mL numune (sıvı gıda, katı gıda homojenizatı ya da uygun seyreltisi) kontaminasyon olmamasına özen gösterilerek aktarılır. Önceden dökülüp depolanmış olan besiyerleri kullanılabilir. Petri kutusunun tabanına daha önceden gerekli tüm bilgilerin yazılmış olması gerekir.



Numune aktarımından hemen sonra alkolde en az 2 dakika bekletilerek sterilize edilmiş Drigalski spatülü ile besiyeri yüzeyine homojen bir şekilde yayılır. Drigalski spatülü, Bunsen beki alevinden hafifçe geçirilerek alkolü uzaklaştırılmış olmalıdır.



Gerekirse 40-45 °C'ta 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 ya da 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.

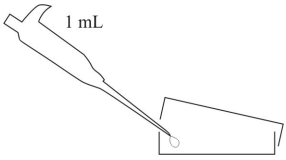
Şekil 07.07. Yayma Plak Yönteminin Uygulanışı

Böylece yayma plak yönteminin duyarlığı aşağıda açıklanan dökme plak yöntemi ile eşitlenmiş ve ayrıca dökme yöntemindeki dezavantajların büyük çoğunluğu ortadan kaldırılmış olur. 1 mL homojenizat ya da seyreltme çözeltisinin 3 adet Petri kutusuna yayılarak yapılan analiz, ISO 6888 numaralı standartta yer almaktadır. 3 adet standart çaptaki Petri kutusuna eşit olarak 1 mL'nin dağıtılması yerine 1 adet 14 cm çaplı Petri kutusuna ekim daha pratiktir, ancak kullanılan besiyeri miktarı 14 cm çaplı Petri kutusunda daha fazladır.

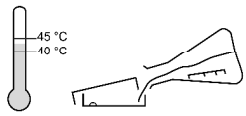
07.06.01.02. Dökme Plak Yöntemi

Analiz edilecek numunedeki hedef mikroorganizma sayısı yayma plak yöntemi ile sağlıklı sayım sonucu alınamayacak kadar düşük ise dökme plak yöntemi uygulanır. Bu amaçla steril Petri kutusuna önce 1 mL numune aktarılır, üzerine

40-45 ºC'ta tutulan erimiş haldeki agarlı besiyeri dökülüp numune ile besiyerinin karışması sağlanır (Şekil 07.08).

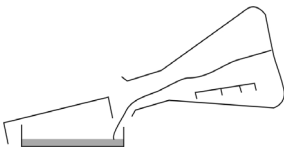


Steril Petri kutusuna önce 1 mL numune (sıvı gıda, homojenizatı ya da uygun bir seyreltisi), kontaminasyon olmamasına özen gösterilerek aktarılır. Petri kutusu tabanlarına önceden gerekli tüm bilgiler yazılmış olmalıdır. Sayım için ardışık 2 seyreltiden paralel ekim yapılır.

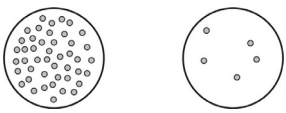


Üzerine 40-45 ºC'ta tutulan steril besiyerinden en az 2 mm kalınlık oluşturacak şekilde dökülür. Standart Petri kutuları için bu miktar 12-15 mL kadardır. Besiyeri dökme sıcaklığı çok kritiktir. Daha sıcak ya da daha soğuk olmamalıdır.

Besiyeri döküldükten hemen sonra düzgün bir zeminde ve dikkatli bir şekilde 888 çizilerek Petri kutusuna aktarılmış numune ile besiyerinin tam olarak karışması sağlanır. Petri kutuları düzgün bir zeminde kendi halinde jelleşmeye bırakılır.



Gerekirse 40-45 ºC'ta 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 ya da 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.

Şekil 07.08. Dökme Plak Yönteminin Uygulanışı

Katı bir gıdada 1000 KOB/g düzeyinde hedef mikroorganizma varsa, 10^{-1} seyreltiden (homojenizat) 1 mL alınıp dökme plak yöntemi ile ekilirse inkübasyon sonunda Petri kutusunda teorik olarak 100 koloni elde edilir. Bir diğer deyiş ile, katı gıdada dökme plak yapılabilmesi için alt sınır, 10^3 KOB/g'dır. Homojenizasyon gerektirmeyen sıvı gıdalarda, doğrudan ekim (10^0) koşulunda bu değer 100 KOB/mL'dir.

Dökme plak yönteminin bazı dezavantajları vardır:

-Besiyeri sıcaklığı yüksek olur ise ısıl (termal) şok ile mikroorganizmalara zarar verir. Kimi mikroorganizmalar koloni oluşturamayacak düzeyde hasar görürken kimileri ölebilir. Enterik patojenlerin büyük çoğunluğu genel olarak yüksek sıcaklığa duyarlıdır.

-Besiyeri sıcaklığı düşük olur ise dökme ve/veya karıştırma sırasında agarda jelleşme olabilir ve sağlıklı bir numune/ besiyeri karışımı gerçekleşmez.

-Bu sorunlar karşısında su banyosu kullanılması çözüm gibi düşünülürse de 45 ^{o}C'ta uzun süre tutulan besiyeri zarar görür.

-Zorunlu (obligat) psikrofiller için uygun değildir. Bunlar ısıl şoka daha duyarlıdır.

-Zorunlu aeroplar ve küfler için uygun değildir. Toplam aerobik koloni sayımında da kullanılmamalıdır. Kimi hücreler, Petri kutusu tabanına yakın yerde besiyeri ile karışmış olacağı için oksijenden yeterince yararlanamaz ve yeterli büyüklükte koloni oluşturamaz.

-Pratik uygulamada koliform grup bakteriler için uygundur.

-Yöntemin uygulanışı deneyim gerektirir.

Bu sorunların hiçbiri yayma plak yönteminde yoktur, ancak dökme plak yöntemi yayma plak yöntemine kıyasla 10 kez duyarlıdır. Çünkü yayma plak yönteminde 0,1 mL ama dökme plak yönteminde 1 mL numune kullanılır.

Basit bir örnekle ifade etmek gerekirse katı bir gıdada 10 KOB/g düzeyinde *Staph. aureus* bulunmasına izin veriliyorsa ve o gıdada 30 KOB/g *Staph. aureus* varsa 10^{-1} seyreltinin (homojenizatın) 1 mL'sinde 3 adet *Staph. aureus* olacaktır. Dökme plak yönteminde 1 mL kullanıldığına göre Petri kutusunda çok muhtemelen 3 koloni oluşacak ve seyreltme faktörü ile çarpılarak 30 KOB/g sayısına ulaşılacaktır. Aynı numune yayma plak yöntemi ile analiz edildiğinde 0,1 mL içinde 1 adet *Staph. aureus* olma şansı sadece %30'dur. Buna göre inkübasyon sonunda %30 olasılıkla 1, %70 olasılıkla 0 koloni olacaktır. 1 koloni oluşur ise analiz sonucu (1 x 10 / 0,1) hesabı ile 100 KOB/g, hiç koloni oluşmazsa analiz sonucu <100 KOB/g olarak verilecektir. Oysa söz konusu katı gıdada 30 KOB/g *Staph. aureus* olduğu varsayılmış idi.

Yayma plak yönteminde 0,1 mL ama dökme plak yönteminde 1,0 mL numunenin Petri kutusuna aktarılması ve seyreltilerin 1:9 (x10) olarak yapılmasının nedeninin hesap kolaylığı olduğu yukarıda belirtilmiş idi. Dökme plak yönteminde basit bir pipetleme hatası ile Petri kutusuna sıvı gıda numunesinin kendisinden (10^{0} seyrelti) 1 mL yerine 1,2 mL pipetlendi ve inkübasyon sonunda 60 koloni sayıldı ise basit orantı ile:

1,2 mL'de 60 koloni varsa
1,0 mL'de x koloni vardır $\Rightarrow$ x= 50 koloni ve sonuç doğrudan 50 KOB/ mL olarak verilir.

Benzer örnekler yayma plak yöntemi ve seyreltilerde 1:9 (x10) yerine başka değerlerde de verilebilir.

Örnek: Homojenizasyon çözeltisi 90 mL yerine 100 mL olarak hazırlanmış, 10 g yerine 12 g gıda numunesi tartılmış, yayma plak yöntemi ile ekimde bu

homojenizattan 0,15 mL aktarılmış ve inkübasyon sonunda 90 koloni sayılmıştır. Çözüm tümüyle geriye giden basit orantı ile elde edilir:

0,15 mL'de 90 koloni varsa
1,0 mL'de x koloni vardır ⇒ x= 600. Homojenizatın her 1 mL'sinde 600 KOB hücre vardır.

Seyreltme faktörü şöyle hesaplanır: [(100 + 12) / 12] = 9,33.

Sonuç 600 x 9,33= 5599 KOB/g'dır. Bu sonuç $5,6x10^3$ KOB/g olarak verilir (bknz ⇒ 07.07. Bölüm; Sonuçların Verilmesi).

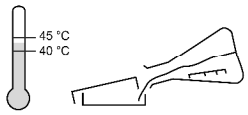
07.06.01.03. Damlatma (Damla Kültür) Yöntemi

Miles-Misra yöntemi (Miles and Misra Method) olarak da bilinir. Petri kutusuna önceden amaca uygun bir agarlı besiyeri dökülüp agarın jelleşmesi beklenir. Analiz sırasında agarın yeteri kadar kurumuş olması gereklidir. Yöntemin uygulanışı şematik olarak Şekil 07.09'da gösterilmiştir.

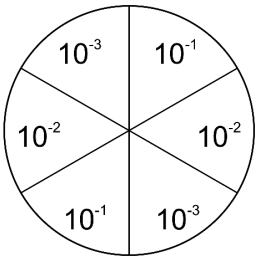
Bu yöntemde birden fazla ardışık seyreltinin 2 paralel olarak tek Petri kutusuna ekimi ile numunedeki mikroorganizma içeriği belirlenir. Standart uygulamada ardışık 3 seyreltiden 2 paralel ekim kullanılır. Ardışık 4 seyreltiden 2 paralel ekim veya titre belirlemek için ardışık 6 ya da 8 seyreltiden tek paralel ekim gibi farklı uygulamalara da sıklıkla rastlanmaktadır.

Standart uygulamada amaca uygun agarlı besiyeri dökülmüş, agar jelleşmiş ve agar yüzeyi yeterince kurumuş Petri kutusunun tabanı kalemle eşit olarak ve baklava dilimi şeklinde altıya bölünür. Amaca göre numuneden ardışık 3 seyrelti hazırlanır (10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3} ya da 10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4} vb.). Her seyreltiden baklava dilimlerinin tam ortasına gelecek şekilde paralel olarak 0,01 mL (10 µL) damlatılır. Damlatma yönetiminin uygulanmasında Petri kutusunun durduğu tezgâh tam olarak düzgün olmalı ve dolayısı ile Petri kutusu yere tam paralel olarak durmalıdır. Damlatma işlemi tamamlandığında çok yaklaşık 20 dk içinde agarlı besiyeri bu damlaları emer. Uygun inkübasyon sıcaklık ve süresi sonunda Petri kutusunda gelişen koloniler sayılarak sonuç standart şekilde hesaplanır. Damlatılan miktar çok yaklaşık olarak 1,0-1,5 cm çaplı alanda yayılır ve dolayısı ile koloniler bu 0,8-1,8 cm^2 alanda gelişir. Sayım için genellikle büyüteç ya da düşük büyütme güçlü mikroskop kullanılır.

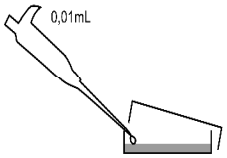
Damla plak yöntemi uygulanışının en büyük avantajı, 6 (ya da 8) Petri kutusu yerine tek Petri kutusu kullanılarak laboratuvar giderlerinde çok ciddi bir tasarruf sağlanıyor olması gibi görülse de bu denli dar alanlarda koloni sayılması genellikle sağlıklı sonuç vermez. Damlatma (damla kültür) yönteminin titre belirlenmesinde kullanılması daha akılcıdır.



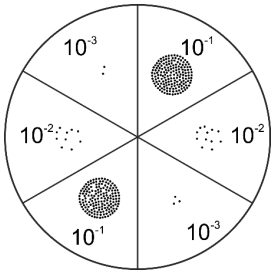
Steril Petri kutusuna 40-45 °C'ta tutulan steril besiyerinden en az 2 mm kalınlık oluşturacak şekilde dökülür. Besiyeri, yeteri kadar kurutulur.



Petri kutusu tabanı cam yazar kalemle baklava dilimi şeklinde tam olarak 6'ya bölünür. Ardışık 3 seyrelti, 2 paralel olmak üzere karşılıklı olarak tabana yazılır.



Her seyreltiden baklava dilimi şeklinde olan üçgen alanlara 0,01 mL (10 µL) damlatılır. Besiyerinin damlayı emmesi beklenir. Petri kutusu tam düz bir alanda olmalı, damla akmamalıdır.



İnkübasyondan sonra büyüteç kullanılarak koloniler sayılır ya da var/yok şeklinde sonuç alınır (titre belirlenir). 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.

Şekil 07.09. Damla plak yönteminin uygulaması

07.06.01.04. EMS Yöntemi

Gıda mikrobiyolojisinde temel sayım yöntemi denildiğinde katı besiyerinde oluşan kolonilerin sayımı anlaşılır. Ancak uluslararası standartlarda kabul görmüş koloni sayımı dışında başka yöntemler de vardır. Bunların içinde En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemi pek çok farklı uygulanış şekli ile oldukça yaygın bir uygulamadır.

Prensip olarak bu yöntemde koloni sayılmaz. Sıvı besiyeri kullanıldığı için zaten koloni oluşması söz konusu değildir. Standart uygulamada pozitif tüpler/ hücreler sayılır ve istatistiksel kurallara göre oluşturulmuş çizelgelerden yararlanılarak numunedeki canlı hücre sayısı, en muhtemel sayı olarak verilir (bknz ⇒ 08.02. En Muhtemel Sayı).

07.06.01.05. Membran Filtrasyon Yöntemi

Yaygın olarak ve günlük uygulamada içme ve kullanma sularının analizinde kullanılan bir yöntemdir. Berrak alkollü ve alkolsüz içecekler, berrak meyve suları, suda tam olarak eriyebilen şeker ve tuz gibi katı gıdalar ile hava ve gazların mikrobiyolojik analizinde de kullanılmaktadır. Yöntemin prensibi, mikroorganizmaların geçemeyeceği kadar küçük gözenek çapına sahip membran (zar) filtreden numunenin geçirilerek mikroorganizmaların filtre üzerinde kalmasının sağlanmasıdır. Mikroorganizmaları tutmuş membran filtre, uygun bir katı besiyeri üzerine yerleştirilir. Uygun inkübasyon sıcaklığında uygun süre sonunda filtre üzerindeki koloniler sayılır.

Membran filtrasyon yöntemi genel olarak 100 ve 250 mL gibi yüksek hacimlerdeki numunelerdeki çok az sayıda bulunan ya da sonucun 0 KOB olması hedeflenen numuneler için uygundur. Yöntem, 08.03. Membran Filtrasyon bölümünde ayrıntılı olarak verilmiştir.

07.06.02. Yöntem ve Seyrelti Seçimi

Gıdaların yasal standartlara uygunluk açısından yapılan mikrobiyolojik analizinde seyreltmeye genellikle gerek yoktur. Katı gıdalarda 10^{-1} düzeyindeki homojenizasyon çoğu analizde yeterlidir. Bununla birlikte çiğ süt örneğinde olduğu gibi yüksek sayıda bakteri içeren gıdaların analizinde seyreltme yapılması gereklidir. Ekim için hangi yöntem ve seyreltme ile çalışılacağının seçiminde iki farklı yaklaşım söz konusudur:

-Yasal sınırların içinde olunup olunmadığının kontrolü,

-Numunedeki gerçek mikroorganizma sayısının öğrenilmesi.

Her şeyden önce, gıdaların mikrobiyolojik analizinde uygulanması gereken asıl yöntemin yayma plak yöntemi olduğu bilinmelidir. Hedeflenen sayı yayma plak yöntemi ile sağlıklı olarak alınamayacak kadar düşük ise dökme plak yöntemi uygulanır. Bu sayı daha da düşük ise EMS yöntemi ile sayım yoluna gidilir. Membran filtrasyon yöntemi ise 100 ya da 250 mL berrak sıvının mikrobiyolojik analizi için uygundur.

İdeal olarak, Petri kutusunda 07.06.01. Ekim Yöntemleri bölümünde verildiği gibi 100 KOB olması hedeflenir. 08.01. Koloni Sayımı bölümünde ise bu konuda istatistiksel bilgiler verilmiştir.

Basit bir örnek olmak üzere, bu kitabın yayımlanmış olduğu tarihte geçerli olan, 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 3. mükerrer sayılı Resmî Gazetede yayımlanmış olan Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği ekindeki Gıda Güvenilirliği Kriterlerine göre kıymada toplam aerobik koloni sayısı n= 5; c= 2; m=10^5 KOB/g ve M= 10^6 KOB/g şeklindedir. Buna göre, 10^{-2} seyreltiden PCA besiyerine 0,1 mL aktarılıp yayıldığında inkübasyon sonunda 100 koloni sayılırsa sonuç 10^5 KOB/g olarak hesaplanır.

Devamında 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltilerden yapılacak ekim ve inkübasyon sonunda hem yönetmelik kriterlerine uygunluk kontrol edilmiş hem de kıymadaki sayı belirlenmiş olur. Bu örnekte 10^{-2} seyreltiden yapılan ekimlerde Petri kutusunda 10-12 gibi düşük sayılarda koloni oluşmuşsa bu değerlere istatistiksel olarak güvenilmez, ancak adı geçen yönetmelik kriterlerine uygunluğun tam olarak sağlandığı anlaşılır. Tersine olarak, 10^{-2} seyreltiden yapılan ekimlerde Petri kutusunda 400-500 sayıda koloni gelişirse bu değerlere de istatistiksel olarak güvenilmez, ancak limitlerin (m değeri) çok aşıldığı da açıktır. Numunede hedeflenen sayı 10^4 KOB/g(mL) ise homojenizattan (10^{-1} seyrelti) ya da sıvı numune ise 10^{-1} seyreltiden yapılacak yayma plak yöntemi ile Petri kutusunda 100 kadar koloni oluşacağı için yine yayma plak yöntemi kullanılır.

Numunede hedeflenen sayı 10^3 KOB/g(mL) ise artık numunenin sıvı ya da katı gıda olması önemli hale gelir. Numune sıvı ise doğrudan (10^0 seyrelti) 0,1 mL ekilebilir. Ancak numune katı ise 10^{-1} seyreltiden yapılacak yayma plak yöntemi ile Petri kutusunda 10 kadar koloni oluşacaktır ve artık bu değer güvenilir değildir. Bu durumda katı gıdada 10^3 KOB/g sonuç bekleniyorsa homojenizattan 1 mL numunenin ekileceği dökme plak yöntemi (ya da 1 mL numunenin 3 standart çaplı veya 14 cm çaplı Petri kutusuna ekimi) uygulanması gerekir. Numunede hedeflenen sayı 10^2 KOB/g(mL) ise sıvı gıdanın kendisinden (10^0 seyrelti) yukarıdaki paragrafta verilen 1 mL numune ekimi yapılabilir. Gıda katı ise EMS yöntemi uygulanması gerekir.

Bununla birlikte adı geçen yönetmelik ekindeki kriterlerde (ya da başka ulusal/ uluslararası kriterlerde), bazı katı gıdalar için <10 KOB/g değerini vermektedir. Bu ifade şöyle okunmalıdır: Katı gıda numunesi homojenizatından 1 mL ekim yapılır, inkübasyon sonunda Petri kutusunda 0 sayıda koloni olmalıdır.

EMS yöntemi, pratik anlamda katı gıdalar için $<10^2$ KOB/g ve sıvı gıdalar için <10 KOB/mL hedef mikroorganizma olan numuneler için uygundur. Sıvı gıdalarda <0,3 EMS/mL ifadesi 10^0; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden 3'er adet sıvı besiyerine yapılan tüm ekim sonucunda toplam 9 tüpün tümünün negatif sonuç vermesinin hedeflendiğini gösterir.

İçme ve kullanma suyu numunelerinde olduğu gibi, koliform bakteri sayısı 0 KOB/250 mL olarak veriliyorsa membran filtrasyon yöntemi kullanılır. Yukarıda verilen bilgiler, çizelge 07.02.'de özetlenmiştir.

Çizelge 07.02. Ekim için yöntem seçiminde hedeflenen en düşük sayılar

Yöntem	Katı gıda	Sıvı gıda
Yayma plak	10^4 KOB/g	10^3 KOB/mL
Dökme plak	10^3 KOB/g	10^2 KOB/mL
En Muhtemel Sayı	10^2 EMS/g	10^1 EMS/mL
Membran filtrasyon	uygulanmaz*	<0,3 EMS/mL

*: Şeker ve tuz gibi suda tam eriyebilen katı gıdalarda, <3 EMS/g olan numunelerde uygulanabilir.

07.06.03. İnkübasyonda 24-48 Saat Kavramı

Başta koliform grup ve *E. coli* olmak üzere pek çok ulusal ve uluslararası standart, inkübasyon süresini 24-48 saat olarak verir. Buradaki ayrıntı şudur: Numune, standarda uygun şekilde ekilir ve inkübasyona bırakılır. 24 saat inkübasyon sonunda tipik koloniler elde edilirse analiz tamamlanır. Bu süre sonunda tipik koloni gelişmesi olmazsa inkübasyona 24 saat daha devam edilir. Benzer durum LST brothta gelişme olması ve Durham tüplerinde gaz görülmesi ya da gelişme olmaması/ Durham tüplerinde gaz görülmemesi için de geçerlidir. Buradaki asıl amaç "analiz edilen numunede hedef mikroorganizmanın standart analiz yöntemi ile [yok] olduğunun kanıtlanmasıdır.

İnkübasyonda 24-48 saat kavramı üzerinde dikkat edilmesi gereken en önemli konu, kimi standartlarda analiz süresinin 24 saat olarak verilmesidir. Bunun anlamı, 24 saat sonrası pozitif sonuçların (tipik koloni gelişmesinin) dikkate alınmaması gereğidir. Örneğin, içme ve kullanma sularının analizlerinde kullanılan Chromogenic coliform agar (CCA) besiyerinde 24 saat sonrasındaki sonuçlar değerlendirmeye alınmaz. Çünkü bu besiyerinde düşük selektivite nedeni ile sahte pozitif sonuç verebilecek koliform grup dışındaki bakteriler, 24 saat sonrasında gelişebilirler ve koliforma benzer kolonileri oluşturabilirler. Bir diğer ifade ile CCA besiyerindeki selektivite/ baskılama sadece 24 saat sürmekte ve bu süre sonunda başka bakteriler de gelişebilmektedir.

07.07. Sonuçların Verilmesi

Yayma plak, dökme plak ve membran filtrasyon gibi koloni sayımına yönelik sayım sonuçları KOB/g(mL), sıvı besiyeri kullanılan EMS yöntemi sonuçları ise EMS/g-mL olarak verilir. Hidrofobik Grid Membran filtrasyon, mikrotiter yönteminde de sonuçlar EMS/g(mL) olarak verilir (bknz⇒ 08.02.04. Bölüm). Havadan örnek alma cihazları kullanılarak çarptırma yöntemi ile yapılan sayım sonuçlarında koloni sayısı alınsa da sonuç yine örneğin "toplam küf 20 EMS/ 10 L hava" şeklinde verilir.

Koloni sayımı yapıldıktan sonra numunedeki sayı hesaplanır ve A,a x 10^b KOB/g(mL) olarak sonuç verilir. Burada A,a tek desimalli sayıyı, b ise 10 üzeri olan sayıyı gösterir. Örneğin $3,7x10^2$ KOB/g, $6,8x10^1$ KOB/mL gibi. Sayım sonucu 10'dan küçük (örneğin 6 KOB) alındı ise (sıvı gıdadan 1 mL ekim) sonuç doğrudan 6 KOB/mL olarak da verilebilir ($0,6x10^1$ gerekli değildir).

Ekimi yapılan seyreltiden inkübasyon sonunda Petri kutusunda koloni gelişmesi görülmezse ekim yöntemi dikkate alınarak sonuç verilir.

-Örnek: Katı gıda numunesi homojenizatından yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmış ve inkübasyon sonunda Petri kutusunda koloni gelişmesi olmamıştır. Eğer 1 adet koloni gelişmiş olsa idi sonuç 1 (koloni sayısı) x 10 (homojenizat;

10^{-1} seyreltisi) x 10 (0,1 mL aktarılmış olması)= 100 KOB/g olacaktı. Bu durumda sonuç <10^2 KOB/g ya da <100 KOB/g olarak verilir.

Tersine olarak bazen Petri kutusunda sayım yapılamayacak kadar fazla koloni gelişmesi olabilir.

-Örnek: Katı gıda numunesinin 10^{-1} seyreltisinden dökme plak yöntemi ile ekim yapılmış ve inkübasyon sonunda Petri kutusunda sayılamayacak kadar yüksek sayıda koloni gelişmiştir. Sayım sonucu >300 (genel olarak kabul edilen üst sınır) x 10 (10^{-1} seyreltisi) x 1 (1 mL aktarılmış olması)= >3,0x10^3 KOB/g(mL) olarak verilir. Bazı laboratuvarlarda, bu gibi sonuçlar SÇK (sayılamayacak kadar çok) olarak ifade edilse de sayısal değerle >3,0x10^3 KOB/g(mL) şekli daha doğrudur.

EMS yöntemi ile yapılan ekim sonuçları 9,3 EMS/mL, 240 EMS/g vb. şekillerde verilir. Ekimi yapılan tüplerin tümünde negatif sonuç alınırsa sonuç EMS çizelgesinde <0,3 olarak görülür. Seyreltme faktörü dikkate alınarak sonuç <0,3 EMS/mL ya da <3 EMS/g vb. şekillerde verilir. Tüplerin tümü pozitif sonuç verirse bu kez yine seyreltme faktörü dikkate alınarak sonuç >110 EMS/mL ya da >1100 EMS/g vb. şekillerde verilir.

Var/yok analiz sonuçları ise var/ 25 g(mL) ya da yok/ 25 g(mL) olarak verilir.

Membran filtrasyon yöntemi ile yapılan analizlerde koloni sayılabiliyorsa örneğin koliform bakteri 3/ 250 mL ya da koloni gelişmesi olmamış ise örneğin *E. coli* 0/ 250 mL olarak verilir.

Çoğu bilimsel araştırmada sayım sonuçları logaritmik değerlerle ifade edilir ve bu şekilde istatistiksel analize alınır. Örneğin, log 5,7 KOB/g; <log 2,0 KOB/mL gibi.

Sayım sonuçlarının verilmesinde en büyük sorunlardan birisi sonuçların yorumlanmasıdır. Herhangi bir sıvı gıda numunesinde *E. coli* limiti <0,3 EMS/mL olarak belirlenmişse ve analiz sonunda 10^0; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerin her birinden 3'er tüp olmak üzere toplam 9 tüpün ekimi ve inkübasyonu sonunda 9 tüpte negatif sonuç alınırsa sonuç <0,3 EMS/mL olarak verilir. Ancak bu ifade analiz edilen numunenin 1 mL'sinde 0 sayıda *E. coli* olduğunu ifade etmez. EMS yöntemi kullanılmıştır ve sonuç <0,3 EMS/mL olarak verilir.

Burada görülen temel çelişki orijinal numunenin 10^0 seyreltisinden 3 adet sıvı besiyerine 1'er mL ekilmiş ve 3 tüpte de sonuç negatif olarak alınmıştır. Var/ yok analizi mantığı ile numunenin 1 mL'sinde *E. coli* yoktur ve bu analiz sonucu, bir anlamda 3 paralelli olarak alınmıştır.

Ancak analiz yöntemi yaklaşımı ile hiçbir sorun ya da çelişki yoktur. Bu örnekteki analiz sonuçları EMS analiz yöntemi kurallarına göre değerlendirilirse sonuç *E. coli* <0,3 EMS/mL olarak verilir. Aynı sonuç var/yok analiz yöntemi kurallarına göre değerlendirilirse sonuç *E. coli* 0/mL olarak verilir. Buradaki

ayrıntı analizin metot bölümüne EMS ya da var/yok analiz yöntemi yazmaktan ibarettir.

Analiz sonuçlarının verilmesinde bir başka sorun var/yok testlerinde sonuç bildirimidir. Kimi laboratuvarlar, analiz sonucunu örneğin "*Salmonella* yok/ 25 g(mL)" olarak verirken kimileri "25 g(mL) numunede *Salmonella*'ya rastlanmadı ya da bulunamadı" şeklinde vermektedir.

Doğru ifade, "rastlanmadı/ bulunamadı" şeklinde olandır, çünkü "yok" ifadesi kesin bir sonucu tarif eder. Oysa mikrobiyolojik analizlerin genel mantığı ve laboratuvar ilgili analiz yöntemini tam doğru olarak uygulamış olsa bile sahte negatif sonuç almış olabilir.

Analiz sonuçlarının yorumlanmasında bir başka sorun, "toplam bakteri" ya da günümüzde daha yaygın kullanılan bir diğer ifade ile "toplam mezofil aerobik koloni" sayısıdır. Yoğurt gibi gıdaların günlük analizinde toplam mezofil aerobik koloni 0 KOB/g ama laktik asit bakterisi 10^8 KOB/g gibi bir sonuç, gıda mikrobiyologu açısından son derece normal iken "toplam bakteri" ya da bir diğer ifade ile "toplam mezofilik aerobik koloni" kavramını yeterince bilmeyen/ bilmesi beklenmeyen karar verici yetkililer tarafından "analiz sonuçlarının güvenliği" konusunda endişe oluşturmaktadır (bknz⇒ 09.05. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri bölümü).

Yoğurt analizinde laktik asit bakteriler sayısının toplam mezofil aerobik bakteri sayısından fazla çıkma nedeni laktik asit bakterilerinin fermente süt ürünlerini ilgilendiren bölümünün MRS agar ve M17 gibi zengin besiyerlerinde gelişip koloni oluşturabilmeleri, ancak PCA gibi basit bileşimli bir genel besiyerinde gelişip koloni oluşturamamalarıdır. Turşudan yapılan laktik asit bakteri sayısı ise toplam mezofil aerobik bakteri sayısından fazla çıkamaz[7], çünkü laktik asit bakterilerinin bu bölümü PCA'da rahatlıkla gelişebilir.

Ancak hiçbir koşulda *E. coli* sayısı, toplam koliform grup sayısından fazla olamaz, çünkü aynı besiyerinde önce toplam koliform bakteri sayılır ve bunların içinde *E. coli* olanlar belirlenir. Dolayısıyla *E. coli* sayısı en fazla olarak toplam koliform grup bakteri sayısına eşit olabilir.

[7] Türk tipi hıyar turşusundan yapılan ekimlerde MRS agar sayım sonucu $4{,}2 \times 10^6$ KOB/mL, ancak PCA sayım sonucu $2{,}8 \times 10^6$ KOB/mL olarak alınırsa bu gibi küçük farklar istatistiksel dağılım çerçevesinde kabul edilebilir. Benzer şekilde aynı numuneden yapılan ekim sonucunda koliform bakteri sayısı, toplam mezofil aerobik bakteri sayısından biraz daha yüksek olarak alınabilir.

08. SAYIM YÖNTEMLERİ

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

08.01. Koloni Sayımı 271
08.01.01. Koloni Sayısının Hesaplanması 272
08.01.02. İdentifikasyon Esaslı Sayım ve Doğrulama 275
08.01.03. Sonuçların Verilmesi 276
08.02. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi 277
08.02.01. Genel Bilgiler 277
08.02.02. EMS Yönteminin Uygulanışı 283
08.02.03. Tüplerin Değerlendirilme Kuralları 285
08.02.04. EMS Yönteminde Sonuçların Verilmesi 287
08.02.05. Sonucun EMS Olarak Verildiği Diğer Analizler 287
08.02.05.01. Hidrofobik Izgaralı Membran Filtre (HGMF) 288
08.02.05.02. Mikrotiter Plak 289
08.02.05.03. Colilert Sistemi 290
08.03. Membran Filtrasyon 291
08.03.01. Genel Bilgiler 291
08.03.02. Membran Filtrasyon Yönteminin Uygulanışı 293
08.03.03. Membran Filtrasyon Yönteminde Seyreltme 294
08.03.04. Membran Filtrasyonda Sonuçların Verilmesi 295
08.04. Metabolizmaya Dayalı Sayımlar 295
08.04.01. Empedans (Kondüktans) Ölçümü 297
08.04.02. Metilen Mavisi ve Resazurin İndirgeme Testi 298
08.04.03. Durham Tüpü ile Gaz Çıkış Süresinin Ölçülmesi 299
08.05. Mikroskobik Sayımlar 299
08.05.01. Breed Yöntemi 299
08.05.02. Howard Lamı/ Lameli 301
08.05.03. Thoma Lamı 302
08.05.04. Direkt Epifloresan Filtre Tekniği (DEFT) 304
08.06. Membran Filtrasyon/ Floresan Boyama Entegrasyonu 305

08.01. Koloni Sayımı

Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi (07.) bölümünde anlatıldığı gibi mikrobiyolojik analizlerde temel sayım yöntemi koloni sayımıdır. Koloni sayımı yayma plak, dökme plak, damlatma ve membran filtrasyon yöntemleri ile yapılabilir. Damlatma yöntemi ile sayım yaygın olarak kullanılmaz.

Yine yukarıda aynı bölümde verildiği şekli ile Petri kutusunda yayma ve dökme kültürel ekim yöntemlerinde değerlendirmeye alınması gereken koloni sayısı konusunda farklı yaklaşımlar vardır. Özetle, farklı kaynaklara göre:

-Petri kutusundaki 25-250 adet koloni sayısı istatistik kurallar çerçevesinde güvenlidir,

-Petri kutusundaki 30-300 adet koloni sayısı istatistik kurallar çerçevesinde güvenlidir,

-Petri kutusundaki 15-250 adet koloni sayısı istatistik kurallar çerçevesinde güvenlidir.

-FDA, VRB Agar besiyerinde koliform grup bakteri sayımında 1-154 adet koloni sayısını benimsemiştir,

-Maya ve özelikle küf sayımında koloni çapı dikkate alındığında farklı standartlara erişilebilir. Genellikle 15-150 KOB/ Petri kutusu kabul edilir.

Laboratuvar, hangi mikroorganizmanın sayımında hangi sınırları esas alacağını belirlemeli ve kalite kayıtlarına bu şekilde geçirmelidir. Sonuçların verilmesinde de farklı uluslararası standartlarda farklı uygulamalara rastlanmaktadır.

08.01.01. Koloni Sayısının Hesaplanması

İnkübasyon sonunda Petri kutularında sayım hızla yapılmalıdır. Herhangi bir nedenle inkübasyon sonrasında sayım yapılamayacak ise Petri kutuları buzdolabında (+5±3) ^{o}C'ta en fazla 24 saat depolanabilir. Hafta sonu ya da bayram tatili vb. nedenlerle 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 (ya da 25-250) arasında koloni içeren seyreltilerdeki ekimler dikkate alınır iken, güncel standartlara göre ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının ağırlıklı aritmetik ortalaması alınarak numunedeki sayı hesaplanır. Bu uygulamada da yine 30-300 (ya da 25-250) vb. sınırlar dikkate alınır. Bu hesaplamada kullanılan formül:

$N = C / [V(n_1 + 0,1n_2)d]$ şeklindedir. Burada;

N= Gıda numunesinin 1 g(mL) miktarındaki 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 adedidir ve $0,1n_2$ olmasının nedeni ağırlıklı aritmetik ortalama alınmasıdır.
d= Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır.

Aşağıda bir sayım sonucunun değerlendirme örneği vardır. Laboratuvar, 15-250 KOB/ Petri kutusu standardını benimsemiştir.

Örnek: Yayma kültürel sayım yöntemi uygulanmış, her seyreltiden 2'şer Petri kutusuna paralel 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 (yayma kültürel sayım için Petri kutularına 0,1'er mL pipetlenmiştir)
n_1= 2 (10^{-2} seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)
n_2= 2 (10^{-3} seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)
d= 10^{-2} = 0,01 (ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır)
N= C / [V x (n_1 + 0,1 x n_2) x d]
N= 453 / [0,1 x (2 + 0,1 x 2) x 10^{-2}]
N= 453 / [0,1 (2,2 x 0,01)]
N= 205.909,09

Bu değer, virgülden sonra 1 desimal ile gösterilip sonuç 2,1x10^5 KOB/ g(mL) olarak verilmelidir.

Yukarıdaki örnek, 15-250 KOB/ Petri kutusu sınırında değerlendirilmiştir. Eğer 25-250 koloni sınırında değerlendirilirse sonuç aşağıdaki gibi olacaktır:

C= 219 + 185 + 28 = 432
V= 0,1 (yayma kültürel sayım için Petri kutularına 0,1'er mL pipetlenmiştir)
n_1= 2 (10^{-2} seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)
n_2= 1 (10^{-3} seyreltiden ekim yapılan 1 Petri değerlendirmeye alınmıştır)
d= 10^{-2} = 0,01 (ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır)
N= C / [V x (n_1 + 0,1 x n_2) x d]
N= 432 / [0,1 x (2 + 0,1 x 1) x 10^{-2}]
N= 432 / [0,1 (2,1 x 0,01)]
N= 205.714,29; 2,1x10^5

Desimalin yuvarlatılması konusunda da farklı yaklaşımlar vardır. 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 yapılabilmektedir. Bu örnekte 205 sayısındaki "0" çift sayıldığı için yuvarlatma aşağı doğru yapılıp 200 olarak verilmektedir. Kuşkusuz, bu yönteme göre 195 sayısı da yuvarlatıldığı zaman 200 değeri elde edilmektedir. Bu uygulama, FDA tarafından benimsenmektedir.

Her ne kadar mikrobiyolojik analiz sonucu olarak yukarıdaki örnekte hesaplanan değer kullanılsa da gerçek sayının bu olduğu beklenmemelidir. Petri kutusundaki koloni sayısı azaldıkça istatistik açıdan hata olasılığı artmakta, tersine Petri kutularındaki koloni sayısı arttıkça bu tip hata olasılığı azalmaktadır. Ancak bu kez sayım yapılırken bazı kolonilerin sayılamaması nedeni ile başka bir hata ortaya çıkmaktadır.

Sayım sonucu ile bulunan değerin %95 güvenlik sınırları ile alabileceği değerlerin hesaplanmasında kullanılan formül:

$\delta = \{[(C / B) + (1,92 / B)] \pm [(1,96 \times \sqrt{C} / B)]\} / d$ şeklindedir.

Bu formülde B olarak gösterilen değer, B= V(n_1 + 0,1 x n_2) ile hesaplanır. 1,92 ve 1,96 değerleri istatistik sabitlerdir. Diğer birimler yukarıdaki formülde açıklanmıştır.

Yine yukarıdaki örnekte 2,1x10^5 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 x (2 + 0,1 x 2)= 0,22 ve

C= (219 + 185 + 28 + 21)= 453 olmak üzere;

δ= {[(453 / 0,22) + (1,92 / 0,22)] ± [(1,96 x $\sqrt{}$453 / 0,22)]} / 0,01

δ= {[2059,09 + 8,73] ± [1,96 x (21,28 / 0,22)]} / 0,01

δ= {[2059,09 + 8,73] ± [1,96 x 96,73]} / 0,01

δ= {[2067,82] ± [189,59]} / 0,01

δ_1 = 2257,41 / 0,01= 225.741= 2,3x10^5

δ_2 = 1878,23 / 0,01= 187.823= 1,9x10^5

olarak hesaplanır.

Bir diğer deyiş ile ilk formül ile elde edilen 2,1x10^5 değeri %95 güvenlik sınırları içinde 2,3x10^5 ile 1,9x10^5 arasındaki bir değer olması beklenir. Yuvarlatma yapılmadan alınan N= 205.909; δ_1= 225.741; δ_2= 187.823 değerleri kullanıldığında hata olasılığı

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

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

15'ten az koloni sayılmama kuralı dikkate alınmadan ve yukarıdaki örneğe 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, δ_1= 24.689 ve δ_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 eksende sayım yapılıp 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 yapılıp ortalama alınır ve yine Petri kutusu alanı ile orantı kurularak sonuç bulunur. Her iki koşulda da sonuç, "tahmini" 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 eksiği 80 olup bu kez kabul edilebilir sınır içindedir. Analiz yapan kişinin lehine olarak büyük değer esas alınabileceği gibi analiz sonucunun daha duyarlı olması açısından küçük değer de dikkate alınabilir. Bu konu ilgili talimatta açık bir şekilde belirtilmelidir.

Sayımda dikkat edilmesi gereken bir diğer 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.

08.01.02. İdentifikasyon Esaslı Sayım ve Doğrulama

Bir numunede sayım için yarı selektif bir besiyeri kullanıldı ise hedef mikroorganizma sayımı, belirli bir identifikasyon işleminden sonra yapılabilir.

Örneğin, koliformların sayımı için yaygın olarak kullanılan VRB agar besiyerinde gelişen tipik koloniler, koliform grup olarak sayıldıktan sonra bunların içinde kaç adet *E. coli* olduğu da belirlenebilir.

Bu amaçla koliform grup bakteri kolonileri içinden koloni sayısına göre 5-20 arasında olmak üzere rastgele seçim yapılıp 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 numunedeki *E. coli* sayısı hesaplanır. Bu şekilde elde edilen sonucun sadece tahmin olduğu unutulmamalıdır.

Örnek: Petri kutusunda toplam 110 koloni içinde 60 adet tipik koliform bakteri kolonisi vardır. Bunlardan rastgele olarak 15 adedi izole edilmiş ve 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* olarak hesaplanır. 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 ve bunlardan rastgele seçilen 10 koloniden 4 adedi *E. coli* olarak doğrulandı ise bu kez Petri kutusunda 28 *E. coli* olduğu hesaplanır (tahmin edilir).

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.

08.01.03. Sonuçların Verilmesi

Katı besiyerinde yapılan sayım sonuçlarının verilmesinde koloni oluşturan birim (KOB; colony forming unit CFU) esas alınır. Koloni sayısı hesaplandıktan sonra sonuç katı gıdalarda (örneğin $7{,}3x10^2$) KOB/g, sıvı gıdalarda (örneğin $3{,}2x10^1$) 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 g 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) x (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}) x (0,1)]} = 1 / 0,1 x 0,1 = 100; sonuç "100 KOB/g'dan daha az (<100 KOB/g)" 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}) x (1)] } = 1 / 0,1 x 1 = 10; sonuç "10 KOB/g'dan daha az (<10 KOB/g)" olarak verilir.

Örnek: Sıvı gıdanın kendisinden (10^0 seyrelti) yayma yöntemi ile 3 Petri kutusuna toplam 1 mL dağıtılmış ve koloni gelişmesi olmamıştır. Formüle göre sayı
< { 1 / [(10^0) x (1)] } = 1 / 1 x 1= 1; sonuç "1 KOB/mL'den daha az (<1 KOB/mL)" olarak verilir.

Sayım sonuçlarının verilmesinde farklı kurallar da uygulanabilmektedir. Örneğin FDA, süt ve ürünlerinin analizinde PCA besiyerinde toplam bakteri sayımı için 0-24 arasında koloni bulunan Petri kutularını "<25 x seyreltme faktörü" olarak verilmesini isterken koliform analizinde VRB agar 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.

08.02. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

08.02.01 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 anılırdı. Yöntemin esası ardışık 3 seyreltiden 3'er adet sıvı besiyerine 1'er mL ekim ve ardından 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 numunedeki 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.

EMS yöntemi, tüp seyreltme yöntemi ile yarı kantitatif sayımın modifiye edilmiş şeklidir. Tüp seyreltme yöntemi, "titre belirlemek" için halen günlük uygulamada kullanılmakta olup 07.02.07. 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. İnkübasyon sonunda tüpler (+) ya da (–) olarak değerlendirilir.

İçinde 1000/ mL canlı hücre olan bir çözeltiden yapılan standart seyreltmeler ve ardından amaca uygun sıvı besiyeri olan tüplere 1'er mL ekim ve inkübasyon sonunda tüpler aşağıdaki gibi değerlendirilir.

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
(+)	(+)	(+)	(+)	(–)	(–)

Şekil 08.01. Tüp Seyreltme Yöntemi

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 yani 1 mL'de 1 adet 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 şekil 08.01'deki gibi bir sonuç alınırsa sonuç, "örnekte 10^3/mL ile 10^4/mL arasında mikroorganizma var" şeklinde verilir ve bu örnek için bu sonuç doğrudur.

Numunenin 1 mL'sinde 800 canlı hücre olduğu varsayalım. 10^{-1} seyreltide mL'de 80; 10^{-2} seyreltide mL'de 8 ve 10^{-3} seyreltide mL'de 0,8 adet canlı hücre olacaktır. mL'de 0,8 adet canlı hücre olmasının anlamı 1 mL'de 1 adet canlı hücre 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 numunede 1.000 ile 10.000/mL arasında canlı hücre olduğuna karar verilir, oysa sadece 800 adet/mL canlı hücre vardır. Dolayısı ile tüp dilüsyon yöntemi bu örnekte görüldüğü gibi sağlıklı sonuç vermeyebilir.

Aynı numunede her seyreltiden 10'ar adet sıvı besiyerine ekim yapılırsa basit olarak 10^{-3} seyreltiden yapılan ekimde çok muhtemelen 8 (+) ve 2 (–) sonuç alınacaktır. 10^{-4} seyreltiden ise çok 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 değerlendirilir ve elde edilen kod aracılığı ile örnekteki sayı "tahmin edilerek" verilir.

Her seyreltiden 3 ya da 5 veya 10'ar tüpe ekim yapılarak elde edilecek (+) ve (–) sonuçlara göre geliştirilmiş istatistik esaslı çizelgeler bulunmakla birlikte gıda mikrobiyolojisinde en yaygın olarak kullanılan 3'er tüpe ekimdir ve bu kitapta verilen de bu uygulama şeklidir. Su mikrobiyolojisini ilgilendiren bazı analizlerde her seyreltiden 5'er tüpe ekim yapılmaktadır. Kuşkusuz, her seyreltiden 5'er ya da 10'ar tüpe ekim yapılıyorsa değerlendirmede bu ekim şekline özgü çizelge kullanılmalıdır.

Yukarıda verilen örnek bu kez her seyreltiden 3'er tüpe ekim olmak üzere şekil 08.02'de verilmiştir.

0^0	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

Şekil 08.02. EMS Yönteminde Kod Kavramı

Her seyreltiden 3'er tüpe ekim yapıldığına göre her seyreltideki 3 tüpün kaç adedinde (+) sonuç alındığı sayılır ve bu şekilde kod elde edilir. Kod, ardışık 3 seyreltinin (+) değerleridir.

Bir başka ifadeyle yukarıdaki örnekte eğer 10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2} serisi alınırsa kod 3–3–3 ve eğer 10^{-1} ; 10^{-2} ve 10^{-3} serisi alınırsa bu kez kod 3–3–2 olmaktadır.

Numunedeki mikroorganizma yükü hakkında bir bilgi yoksa ya da daha güvenli bir sonuç elde etmek istenirse ardışık 4 seyreltiden ekim yapılır ve sonuçlar alındıktan sonra hangi ardışık 3 seyreltinin EMS çizelgesinde kullanılacağı belirli bir kural çerçevesinde seçilir. Bazı özel araştırmalarda 10^0-10^{10} seyreltilerden ekim yapılması da mümkündür. Ancak yine ardışık 3 seyreltiden elde edilen kod, EMS çizelgesinden okunur.

EMS yönteminde sıvı besiyeri olan tüplerin mutlaka 10 mL olması kural değil genel bir benimseyiştir. Ancak sıvı besiyerine ekimlerde standart olarak 1'er mL (ya da özel uygulamada çift kuvvette besiyerine 10'ar mL) ekim yapılır. EMS yöntemi ile *Staph. aureus* sayımında kullanılan Giolitti-Cantoni Broth 19 mL olarak hazırlanır (bknz ⇒ 14.14. Bölüm). Tersine olarak standart analizde pek çok laboratuvarda 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 08.01). Bundan başka EMS çizelgeleri olduğu da unutulmamalıdır.

Çizelge 08.01'de normal olarak 4^3= 64 adet olasılık verilmesi gerekirken bazı sayım sonuçları verilmemiştir. Normal olarak en seyreltik olan seyreltiden (örneğin 10^{-3}) 3 tüpten 3 pozitif sonuç elde edildi ise bundan 10 kez daha fazla numune 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. Ancak 10^{-2} seyreltiden yapılan ekimde her 3 tüp negatif sonuç veriyorsa 10^{-3} seyreltiden yapılan ekimde pozitif sonuç beklenmemelidir.

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.

Kimi analizlerin sonucunda 0-0-1; 0–0–2 ya da 0–0–3 gibi sonuçlar alındığında bu sonuçların analiz edilen numunedeki yoğun kimyasal koruyucu varlığı ile açıklanmasının hiçbir geçerliliği yoktur. Ekim yapılan ardışık 3 seyreltinin en derişik ilk ikisinde kimyasal korucu derişimi, mikroorganizma gelişmesine izin vermeyecek kadar yüksek ama en düşük derişimdeki son seyreltide artık yeterince seyreldiği için mikroorganizma gelişmesini engelleyemediği ve bu nedenle 0-0-1; 0–0–2 ya da 0–0–3 gibi sonuçların alınmasının normal olabileceği görüşü mikrobiyolojinin temel kurallarına aykırıdır. Çünkü kimyasal koruyucu bu denli yüksek derişimde buluyorsa bakteriyostatik (gelişmeyi durdurucu) değil bakterisit (öldürücü) etki yapar.

Çizelge 08.01. EMS Çizelgesi; EMS/ g(mL) (Partiden 1 örnek alınması içindir).

Pozitif tüpler			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					

EMS sayım yönteminde, 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 numuneden 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 alınırsa ancak bu koşulda kategorinin 3 olarak kabul edilebileceği şeklinde EMS çizelgeleri de bulunmaktadır. Burada partiden sadece 1 numune 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 güvenilmez 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} ve 10^{-2} seyreltilerden 1'er mL ekim yapılması anlamındadır. Sıvı bir gıda numunesinden 10^0; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden 1'er mL ekim yapılması planlanmışken 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltme yapılacak tüplerin bulunmadığını varsayalım (ekim öncesinde kırıldığını ya da steril olduklarından emin olunmaması vb. nedenler). 10^{-1} seyreltiden 1 mL almak ile orijinal numuneden (10^0) 0,1 mL kullanmak ve benzer şekilde 10^{-2} seyreltiden 1 mL almak ile orijinal numuneden (10^0) 0,01 mL kullanmak da matematik olarak aynı şeydir. Buna göre 10^0 seyreltiden 3 tüpe 1'er mL ekim yapıldıktan sonra diğer 3 tüpe 0,1'er mL ve diğer 3 tüpe 0,01'er mL ekim yapılarak sorun çözülmüş olur. Aslında çizelge 08.01'deki 1 mL; 0,1 mL; 0,01 mL ile ifade edilen de budur.

Bu şekilde yapılan ekim sonucunda 2–1–0 değeri elde edildi ise gıdada 1,50 EMS/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.

Buradaki örnekte 10^0; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden ekim yapılmıştır ve en derişik olan seyreltinin 1 mL'sinde 1,50 canlı hücre olduğu, en muhtemel sayı olarak kabul edilir. EMS çizelgesinin okunmasında ardışık 3 seyreltinin en derişik olanı esas alınır.

Katı bir gıdanın analizinde 10^{-1}; 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltilerden yapılan ekim sonucunda yine 2–1–0 kodu elde edildi ise EMS çizelgesinde yine 1,50 değeri görülecektir ancak bu değer en derişik olan tüpteki (10^{-1}) sayıdır ve bu kez sonuç 15,0 EMS/g olarak verilir. Devamında ekim 10^{-2}; 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltilerden yapılmış ve aynı değer alınmış ise sonuç 150 EMS/g'dır.

Bu konuda farklı örnekler verilebilir ancak hepsinin çizelge okunmasındaki mantık aynıdır.

Örnek: Bir su numunesinden 3'er tüpe 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, bu numunenin 10 mL'sinde en muhtemel olarak 1,5 ve dolayısıyla 1 mL'sinde en muhtemel olarak 1,50/ 10= 0,15 adet canlı ve aktif mikroorganizma bulunmaktadır. Burada gözden kaçırılmaması gereken husus, 10 mL numune eklenecek besiyerlerinin çift kuvvet olarak ve 16x160 mm değil daha büyük tüplerde hazırlanmasıdır.

Farklı kaynaklarda EMS konusunda yine her seyreltiden 3'er besiyerine ekim yapılması halinde farklı EMS çizelgelerine 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, 2–1–0 kodu karşılığında 1,50 değeri yerine 15,0 değeri görülür. Bunun nedeni numunenin 10^{-1}; 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltilerden ekim yapılmış olduğunun varsayılması ve sonucun doğrudan verilmesidir.

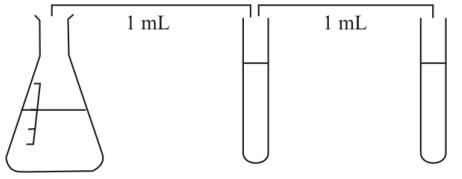
Nitekim 1; 0,1; 0,01 mL ekim çizelgesinde 2–1–0 kodu karşılığında 1,50 değeri görülürken ekime 10^{-1} seyreltiden başlanması koşulunda sonucun 15,0 EMS/ g(mL) olarak verilmesi yukarıdaki örneklerde anlatılmıştır.

Yukarıdaki (şekil 08.02) örneğe göre 3–2–0 kodu elde edilmiştir ve çizelge 08.01'de bu değerin 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.

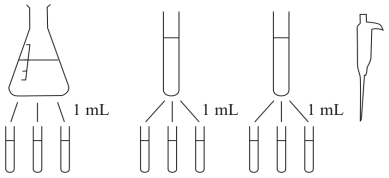
Bu durumda yukarıdaki örnekte 800 hücre/mL olan sayı için çok muhtemel olarak ya 930 ya da 430 sonucu elde edilecektir. Uygulanan yöntemin "En Muhtemel Sayı" olarak adlandırılmasının nedeni de zaten budur.

08.02.02. EMS Yönteminin Uygulanışı

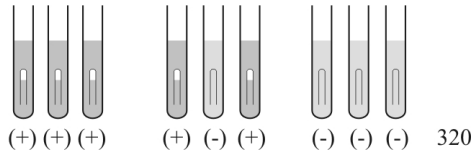
Yöntemin uygulanışı aşağıda özet olarak verilmiştir. Ayrıca şekil 08.03'te yöntemin uygulanışı şematik olarak gösterilmiştir.



Gıda numunesi 1:9 oranında homojenize edilip (10^{-1}), bundan standart yöntemle devam edilerek 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltiler elde edilir. Seyreltmede süt ürünleri için genellikle ¼ Ringer çözeltisi diğer gıdalarda ise genellikle maximum recovery diluent (MRD) 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 pozitif tüplerden sıvı ya da katı besiyerlerine ekim yapılarak da devam edilebilir.

Şekil 08.03. EMS Yönteminin Uygulanışı

-Günlük 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. Aksi halde anafor sonucu Durham tüpüne giren hava, sahte pozitif sonuçlara neden olur.

-Her seyreltiden 3 besiyeri tüpüne ekim yapılır. Tüpler, standart olarak 10 mL sıvı besiyeri olacak şekilde hazırlanır. Standart ekimde seyreltilerden 1'er mL ekim yapılmakla beraber bazı özel uygulamalarda ilk seyreltiden çift kuvvette hazırlanmış besiyerlerine 10'ar mL ekim yapılabilir. Bazı uygulamalarda her seyreltiden 5'er (ya da 10'ar) tüpe ekim yapılır. Bunların değerlendirme çizelgeleri farklıdır.

-Katı gıda numunesinde 10:90 mL şeklinde yapılan ilk seyreltme tamponlanmış peptonlu su ya da CASO (tryptic soy) broth gibi bir genel bir sıvı besiyerinde yapılmış ve diğer tüplerde de besiyeri olarak yine tamponlanmış peptonlu su/ CASO broth kullanılıyor ise ilk seyreltiden steril 3 boş tüpe 10'ar mL aktarılabilir. Bu koşulda katı numuneden ilk üç tüpe doğrudan 1'er g aktarılmış gibi olur. Bunun yerine 10 mL çift kuvvette besiyerine 10 mL homojenizat ekimi daha yaygındır. FDA yöntemine göre *Cronobacter sakazakii* analizinde 3x100 g + 3x10 g + 3x1 g olmak üzere toplam 333 g bebek maması bu şekilde analiz edilir (bknz ⇒ 14.17. bölüm).

-Bazı çalışmalarda canlandırma işlemi uygulanır. Bu amaçla örneğin toplam *Enterobacteriaceae* sayımında tamponlanmış peptonlu su besiyerine (TPS) ekim yapılır, inkübasyon sonunda gelişmenin görüldüğü (pozitif sonuç) tüm tüplerden EE broth besiyerine ekim yapılır ve en son olarak da inkübasyon sonunda bu besiyerindeki pozitif tüplerden VRBD agar besiyerine sürme yapılır. VRBD agarda (+) sonucun elde edildiği TPS tüpleri (+) olarak değerlendirilir.

-Gerekirse tüplerin üzerine sıvı parafin, agar vb. maddeler ilave edilebilir.

-İnkübasyon sonunda tüpler değerlendirilir. Elde edilen kod ile standart EMS çizelgesinden yararlanılarak numunedeki sayı hesaplanır. Sayım sonunda kullanılan tüm malzeme sterilize edilerek yıkanır ya da atılır.

Daha güvenli sonuçlar elde etmek isteniyorsa ardışık 4 seyreltiden ekim yapılıp 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 seyreltik 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 3–3–2 değil 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 2–1–0 değil 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.

Prensip olarak EMS uygulaması amaca/ beklenen sayıya ya da sıvı/ katı gıda numunesi olmasına göre 10^0; 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3} ve 10^{-4} seyrelti aralığında kullanılmakla birlikte araştırma esaslı çalışmalarda çok daha yüksek seyreltiler kullanılabilir. Örneğin yoğurtlardaki kok (streptokok) ve çubuk (laktobasil) sayısını belirlemek için analiz edilecek yoğurt numunesinden 10^{-11}'e kadar seyreltme yapılır. 10^{-4} seyreltiden başlayarak 10^{-11}'e kadar olan tüm seyreltmelerden 3'er adet %10 yağsız süt (skim milk) besiyerine ekim yapılıp

tüpler 37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılır. En seyreltik seyreltiden başlayarak pıhtı oluşan her tüp mikroskopta incelenerek kok ve çubuk varlığı belirlenir. Mikroskobik incelemede 1 adet kok ve/veya çubuk görüntüsü elde edilen tüpler, kok ve/veya çubuk için (+) olarak işaretlenir ve ardışık tüplerden ekim/ kod belirleme kurallarına uygun olarak yoğurt numunesinde kok ve çubuk sayısı belirlenebilir.

08.02.03. Tüplerin Değerlendirilme 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 ya da tryptic soy (CASO) broth gibi genel bir sıvı besiyerindeki toplam canlı bakteri analizinde inkübasyon sonunda tüpte bulanıklık, pozitif sonuçtur.

-Koliform grubu bakteri analizinde lauryl sulfate tryptose (LST) broth ya da brilliant green broth gibi koliform grup için selektif bir sıvı besiyerinde tüplerde bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşması pozitif sonuçtur.

-*E. coli* analizinde MUG'lu besiyerinde tüplerde bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşması ile uzun dalga boylu UV lambası ile floresan ışıma, pozitif sonuçtur.

-*Staph. aureus* analizinde bu bakteri için yeterince selektif olan Giolitti-Cantoni broth besiyerinde inkübasyon sonunda siyahlaşma olan tüplerden Baird-Parker agar besiyerine ekim yapılır. İnkübasyon sonunda 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 başka bir örnek verilmiştir.

Bir sıvı gıda numunesinde 10^0 seyreltiden (orijinal numune) başlayarak ardışık 4 seyreltiden LST broth besiyerine ekim yapılmıştır. 37 °C'ta 24 saat inkübasyon sonunda tüplerde gelişme ve Durham tüplerinde gaz görülen tüpler koliform grup bakteri açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. İkinci aşamada bu tüplerin sadece pozitif sonuç verenlerinden EC broth tüplerine ekim yapılmış ve 44 °C'ta 24 saat inkübasyon sonunda tüplerde gelişme ve Durham tüplerinde gaz görülen tüpler, fekal koliform grup açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Son olarak, EC broth besiyerinde pozitif sonuç veren tüplerden tryptone water besiyerine ekim yapılmış ve tüpler yine 44 °C'ta

inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda besiyerinde gelişme olan tüplere indol testi uygulanmış ve pozitif sonuç verenler *E. coli* olarak işaretlenmiştir[1].

10^0			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 pozitif sonuçlar 3 3 2 1, ⇒ Kod: 3 2 1
U	U	U	U	U	U	*	U	U	U	*	*	Sadece pozitif tüplerden EC Broth besiyerine aşılanır.
+	+	+	+	+	–	*	–	–	–	*	*	Fekal koliform grup bakteriler pozitif sonuçlar 3 2 0 0, ⇒ Kod: 3 2 0
U	U	U	U	U	*	*	*	*	*	*	*	Sadece pozitif tüplerden tryptone water besiyerine aşılanır.
–	+	+	+	–	*	*	*	*	*	*	*	*E. coli* için pozitif sonuçlar 2 1 0 0, ⇒ Kod: 2 1 0

*: Bir önceki basamakta negatif sonuç olduğu için ekime gerek yoktur.

Şekil 08.04. Sıvı bir gıdada EMS yöntemi ile koliform grup, fekal koliform grup ve *E. coli* sayımı

Bu örnekte LST broth besiyerinde 3–3–2–1 kodu elde edilmiştir, ancak ya 3–3–2 ya da 3–2–1 serisi kullanılacaktır. 10^0 serisinden başlanırsa 3–3–2 kodu karşılığı sonuç 110 EMS/mL (kategori: 1) iken, 10^{-1} seyreltiden başlanarak elde edilecek sonuç 3–2–1 kodu karşılığı 15'tir ve sonuçta da kategori yine 1'dir. Ekim 10^{-1} seyreltiden yapıldığı için sonuç 150 EMS/mL olarak hesaplanır. Çizelge 08.01'e göre gerek 3–3–2 gerek 3–2–1 kodu "1" kategorisi ile değerlendirilse de ardışık seride seçim kuralına göre (1'den fazla 3 pozitif) 3–3–2 değil, 3–2–1 serisi esas alınır ve sonuç 150 EMS/mL olarak verilir.

Fekal koliform grup bakteri için elde edilen sonuç 3–2–0–0 şeklindedir. Gerek 3–2–0 gerek 2–0–0 serilerinin kategorisi 1'dir. Yine ardışık seride seçim kuralına göre (1 adet 3 pozitif) 2–0–0 değil, 3–2–0 serisi dikkate alınır ve sonuç 9,30 EMS/mL olarak verilir.

E. coli için 2–1–0–0 kodundaki değerlendirme de aynı esaslara göre yapılır. 2–1–0 ve 1–0–0 serisinde kategori 1'dir. Buna göre 2–1–0 serisi (1'den fazla 3 negatif sonuç) dikkate alınarak sonuç 1,50 EMS/mL olarak verilir.

[1] Gıdalarda *E. coli* analizi, bu standart yöntemle 3 gün sürer. Lauryl sulfate tryptose broth + MUG besiyerinde EMS yöntemiyle koliform grup bakteri ve *E. coli* sayısı 37 °C'ta 24 saat inkübasyon sonunda belirlenir.

08.02.04. 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 (Çizelge 08.02) verilmiştir. Hesaplamalarda standart 1; 0,1; 0,01 mL EMS çizelgesi kullanılmıştır.

Çizelge 08.02. 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(mL)
10^{-1} ; standart	200	9,20 EMS/ g(mL)
10^{-1} ; standart	333	>1100 EMS/ g(mL)
10^{-1} ; ilk seyreltiden 10'ar mL	200	0,92 EMS/ g(mL)

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 ve bu değer 20 ile çarpılarak numunedeki sayı 86,0 EMS/g olarak verilir. Bir diğer ifadeyle burada 1:19 olarak yapılan ilk seyreltme sanki orijinal (10^0) numune 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 homojenizatı), gerçekte orijinal numunenin 20 kez seyreltilmiş olması nedeniyle 4,30 değeri 20 ile çarpılarak gerçek sonuç bulunmaktadır.

08.02.05. Sonucun EMS Olarak Verildiği Diğer Analizler

Standart EMS yöntemi olmadığı halde analiz sonucunun EMS olarak verildiği başka analiz yöntemleri de vardır. Bu analizlerdeki sonucun EMS olarak verilmesinin nedeni bunların da istatistiksel olarak elde edilmiş değerler olmasıdır. Bir başka deyişle burada elde edilen sonuçlar tahmin değerleridir.

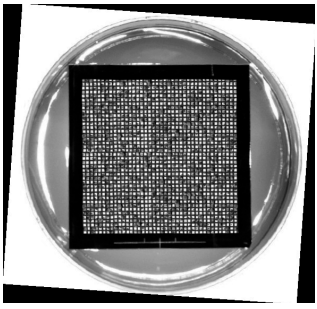
Aşağıda 3 ayrı uygulama anlatılmıştır. Her üçünün de prensibi aynıdır ve analiz yapılan sistemde bir bölme (analiz hücresi) içinde birden fazla mikroorganizma bulunma olasılığıdır.

Yukarıda 07.02.06. Hava ve Yüzey Analizleri bölümünde belirtildiği gibi bu analizde de bir çeşit EMS değeri elde edilir, ancak bu hesaplama/ tahmin yöntemi, aşağıda açıklanan üç yöntemden farklıdır.

Bu bölümde açıklanan temel analiz mantıkları aynı olan üç yöntemde "bir bölme (analiz hücresi) içinde birden fazla mikroorganizma bulunma olasılığı" 08.02.05.01. bölümünde ayrıntılı olarak açıklanmıştır. İzleyen sonraki iki bölümde, bu ayrıntıya yer verilmemiştir.

08.02.05.01. Hidrofobik Izgaralı Membran Filtre (HGMF)

Hidrofobik ızgaralı membran filtrasyon (Hydrophobic Grid Membran Filter; HGMF), asıl olarak ABD'de kullanılan özel bir membran filtre uygulamasıdır. Aşağıda 08.03. Membran Filtrasyon bölümünde açıklanan yöntem Avrupa Birliği ülkeleri ve Türkiye'de kullanılır ve temel olarak koloni sayımı üzerine kurulmuştur. HGMF uygulaması da bir çeşit membran filtrasyondur, ancak bu uygulamada koloni değil, pozitif analiz hücresi sayımı esastır. Sistemin özelliği kullanılan filtredir. Filtrasyon alanı 40x40 olmak üzere 1600 kareden oluşur. Her karenin (hücrenin) alanı ~1,5 mm^2 olup karelerin sınırında hidrofobik bir ızgara sistemi vardır. Filtrasyon sonunda hücre, ızgara üzerinde kalamaz. Her koşulda ya alttaki ya üstteki ya sağdaki ya da soldaki kareye geçer ve burada koloni oluşturur. Kare kenarı hidrofobik bir ızgara ile çevrelendiği için koloni bu hücrenin dışına çıkamaz. Filtrasyon sırasında aynı hücreye tesadüfen birden fazla bakteri düşerse inkübasyon sonunda o hücrede kaç koloni olduğu anlaşılamaz. Dolayısıyla inkübasyon sonunda koloniler değil, pozitif kareler sayılır ve sonuç özel bir formül ile hesaplanarak EMS olarak verilir. HGMF manifold ve filtre şekil 08.05'te gösterilmiştir.



Şekil 08.05. HGMF manifold ve 40x40 kareli filtre

Filtrasyon ve inkübasyon sonunda pozitif hücre sayısı belirlenir ve "Gelişme Görülen Bölmelerdeki En Muhtemel Sayı" (Most Probable Number of Growth Unit; MPNGU) olarak verilir. Bu sonucun elde edilmesi için kullanılan formül

MPNGU= {N x 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. Pozitif karelerin sayılması gözle yapılabileceği gibi bu amaca uygun olarak geliştirilmiş cihazlar aracılığı ile çok daha kısa sürede ve daha doğru olarak da belirlenebilmektedir.

Örnek: Standart 40x40 sayım alanı olan filtrede 620 pozitif alan sayılmıştır.
MPNGU= {1600 x ln [1600 / (1600 - 620)]}
MPNGU= (1600 x ln 1,63)
MPNGU= 784

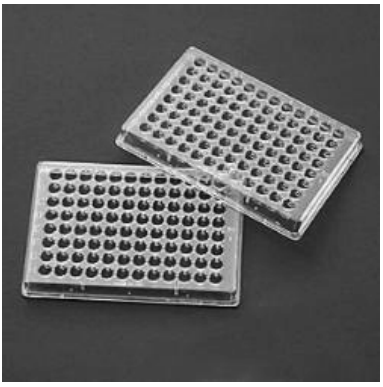
HGMF sisteminde koloni değil alan sayıldığı için filtre üzerinde ideal olarak 20-1520 pozitif saha sayılması, bu sınırların dışındaki sayımlarda ekimin tekrarlanması önerilmektedir. Prensip olarak gözle yapılan sayımlarda pozitif alan sayısı 200'ü geçmiyor ise pozitif alanların tümünün sayılması gerekmektedir. Bu değeri aşan sayımlar için her biri 40 alan olmak üzere yatay ve düşey boyutta 4'er (toplam 8) hat boyunca sayım yapılıp sonuç 5 ile çarpılarak hesaplanır.

HGMF sistemi 2 günde sonuç veren küf analizinde de kullanılmaktadır. Bu amaçla numune HGMF sisteminden geçirilir ve özel bir besiyerinde (YM11 agar) inkübasyona bırakılır. Küf kolonilerinin henüz çıplak gözle ve hatta mikroskop kullanılarak dahi görülemediği inkübasyonun 48. saatinde küflerin oluşturduğu metabolitler, besiyerindeki indikatör ile belirlenebilir. Buradaki asıl ayrıntı, metabolitlerin besiyerine dağılmaması ve ~1,5 mm^2 alan içinde hapsedilmesidir. Hidrofobik ızgara sistemi, küf metabolitlerinin bu alanda hapsedilmesini ve dolayısıyla indikatör aracılığı ile gözle fark edilebilecek derişime erişmesini sağlar. Görüldüğü gibi bu uygulamada temel faktör, metabolitlerin ~1,5 mm^2 alan içinde hapsedilmesidir. HGMF sistemi kullanılmadan sadece bu yönteme entegre olmuş YM11 agar besiyerinde standart analiz yöntemleri ile yapılan ekim ve 48 saat inkübasyon sonunda küf sayılması mümkün değildir.

YM11 ya da amaca uygun bir başka katı besiyeri kullanılarak yapılan standart ekim ve 48 saat inkübasyon sonunda Petri kutularında hiçbir küf kolonisi gözlenemeyeceği için analiz sonucu, çok hatalı olarak <10 KOB/mL ya da <100 KOB/g olarak verilecektir.

08.02.05.02. Mikrotiter Plak

Standart EMS yöntemine kısmen benzer. Geçerliliği, 2016 yılında onaylanmış olan ISO 9308-3 numaralı standartta verildiği gibi minyatürize edilmiş EMS yöntemi olarak da bilinir. Plastik ve U tabanlı, genellikle tek kullanımlık, 8x12 olmak üzere 96 kuyucuğu olan mikrotiter plaklara amaca uygun steril sıvı besiyeri aktarılır. Analizi yapılacak olan numuneden bu kuyucuklara ekim yapılır. Bu amaçla genellikle çok kanallı otomatik pipet kullanılır. Mikrotiter plak ve çok kanallı otomatik pipet, şekil 08.06'da gösterilmiştir.



Şekil 08.06. Mikrotiter plak ve çok kanallı otomatik pipet

Ekim sırasında hangi hücreye kaç adet bakteri düştüğü bilinemez. İnkübasyon sonunda pozitif hücreler sayılır ve özel formüller ile numunedeki mikroorganizma sayısı belirlenip sonuç EMS olarak verilir. Kullanılan besiyerine göre (örneğin, LST broth + MUG) doğrudan *E. coli* sayısı belirlenebilir. Bu yöntemde farklı seyreltmeler ile kuyucuklara farklı paralel ekimler yapılabilmektedir. Buna bağlı olarak hesaplamalarda kullanılacak formüller farklıdır. Okuyucu bu yöntemi kullanacak ise ilgili standarda tam olarak hâkim olmalıdır.

Mikrotiter plak ve çok kanallı otomatik pipet, biyoteknoloji laboratuvarlarında çok sıklıkla kullanılan malzemelerdir.

08.02.05.03. Colilert Sistemi

Gıda mikrobiyolojisi analiz laboratuvarında deneyimli/ eğitimli personel bulunmadığı koşullarda, örneğin sularda koliform grup/ *E. coli* analizi için en ideal analiz sistemlerinden birisidir. Var/yok[2] ya da sayım amaçlı kullanılan farklı çeşitleri bulunmaktadır. Bu bölümde sayım amaçlı çeşit anlatılmaktadır.

Basitçe, su numunesine amaca uygun olarak hazırlanmış steril dehidre besiyeri eklenir ve karıştırılır. Dehidre besiyeri analiz edilecek su numunesinde tam olarak çözüldükten sonra özel olarak hazırlanmış steril bir plastik torbaya aktarılır. Bu torbada amaca göre farklı sayılarda analiz hücreleri vardır. Su numunesi bu torbaya aktarıldıktan sonra bilgisayar yazıcısına benzeyen bir cihaza yerleştirilir. Bu cihaz, torbadaki analiz hücrelerini basit bir ısıl işlem ile birbirinden ayırır. Bu şekilde su numunesindeki mikroorganizmalar, rastgele olarak farklı analiz hücrelerine dağılır.

[2] Sularda, koliform grup bakteriler (Bknz ⇒ 14.06. bölüm) ve *E. coli* (Bknz ⇒ 14.08. bölüm) ile enterokokların (Bknz ⇒ 14.21. bölüm) var/yok analizine bu kitapta ayrıntılı bilgi verilmiştir.

Yukarıdaki örneklere benzer şekilde, bir analiz hücresi içinde başlangıçta kaç adet bakteri olduğu bilinemez. İnkübasyon sonunda analiz hücrelerindeki renk değişimi ve ardından uzun dalga boylu UV lamba altında floresan ışıma veren analiz hücreleri sırası ile toplam koliform grup bakteri ve *E. coli* olarak işaretlenip özel bir EMS çizelgesi aracılığı ile sonuç alınır.

08.03. Membran Filtrasyon

08.03.01. Genel Bilgiler

Membran filtrasyon sistemi, özellikle içme ve kullanma suyu ile berrak meyve suları, pulplu olmayan gazlı meşrubat, filtre edilmiş bira ve şarap gibi filtrasyonda sorun çıkarmayan ve çok az sayıda mikroorganizma bulunabilen numuneler için idealdir. Benzer şekilde, suda tam olarak eriyebilen şeker, şekerleme ve tuz gibi gıdaların analizi ile hava ve gaz analizlerinde de membran filtrasyon kullanılmaktadır.

Bir sterilizasyon tekniği olarak membran filtrasyon konusu 05.04. bölümde verilmiştir. Membran filtrasyon yöntemi ile sayımın ilkesi de sterilizasyona benzer. Analiz edilecek materyaldeki mikroorganizma, filtre üzerinde kalır.

Her ne kadar mikrobiyolojik analiz kuralları uyarınca membran filtrasyon yöntemi 1 KOB/ g(mL)'den daha az sayıda mikroorganizma içeren gıdaların analizi için uygun bir yöntem ise de pratik kullanımı nedeni ile gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında bundan çok daha fazla sayıda mikroorganizma içeren gıdaların ve özellikle çeşitli suların (yüzey suları, atık sular vb.) analizinde de yaygın kullanım alanı bulmuştur.

Bu yöntemde seyreltme kavramı ile yıkama ve taşıma amacıyla kullanılan steril yıkama çözeltisinin ya da steril saf suyun hesaplamalarda karıştırılmamasına özen gösterilmelidir. Örneğin, 1 g toz şekerde 60 adet canlı (koloni oluşturabilen) bakteri olduğu varsayalım. 1 g şekerin 9 mL ya da 43 mL seyreltme sıvısında eritilmesinin "seyreltinin tümünün filtreden geçirilmesi koşulu ile" hiç farkı yoktur. Her koşulda 1 g'daki 60 adet bakteri filtre yüzeyinde kalacak ve inkübasyon sonunda 60 koloni oluşacaktır. Oysa 1 g şekerin 9 mL seyreltme çözeltisinde eritilmesi ve buradan (10^{-1} seyreltisi) 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 da önemli değildir. Çünkü bu su sterildir ve önemli olan filtre edilecek numune miktarıdır.

İçme suyu analizinde genellikle 250 mL su numunesi filtre edilir. Yukarıdaki örnekte olduğu gibi filtreyi ıslatmak amacıyla önceden ilave edilen steril su miktarı önemli değildir. Burada sadece 250 mL analiz numunesinin filtreden

geçirildiği dikkate alınmalıdır. Bu içme suyu klorlanmış ise klor da filtre üzerinde kalacak ve mikroorganizma gelişmesini baskılayacaktır.

Bunun önüne geçmek için analiz edilecek numune filtreden geçirildikten sonra bol miktarda (~250 mL ya da gerekirse daha fazla) steril saf su ya da özel olarak bu amaçla hazırlanmış membrane filter rinse fluid geçirilerek filtre bir anlamda yıkanır. Membrane filter rinse fluid uygulamasında 3 kez 100 mL geçirilmesi önerilmektedir.

Filtrasyon sonunda membran filtre uygun bir katı besiyeri üzerine yerleştirilir:

-Membran filtre üreticisi ticari firma tarafından steril plastik Petri kutusu içinde besiyeri emdirilmiş ve kurutulmuş ped (özel bir karton), steril saf su ile (~ 3,0-3,5 mL) ıslatılarak besiyeri aktive edilir ve filtre bu besiyeri üzerine yerleştirilir.

-Membran filtre üreticisi ticari firma tarafından steril plastik Petri kutusu içinde sağlanan boş bir pede (özel bir karton), ticari firma tarafından sağlanan ve kullanılan pede yetecek kadar (~ 2 mL) steril sıvı besiyeri ilave edilerek besiyeri aktive edilir ve filtre bu besiyeri üzerine yerleştirilir. Sıvı besiyeri laboratuvarda da hazırlanabilir. Özellikle araştırma laboratuvarları farklı bileşimlerde besiyeri hazırlamaktadırlar.

-Ticari firmalar tarafından sağlanan hazır agarlı besiyerleri üzerine de membran filtre yerleştirilebilir. Agarlı besiyeri laboratuvarda da hazırlanabilir. Araştırma laboratuvarları farklı bileşimlerde besiyeri hazırlamaktadırlar.

Her analiz/ araştırma laboratuvarı kendi amaçları, alışkanlıkları, analiz sıklığı vb. faktörlere göre bu üç farklı gruptaki besiyerlerinden bir ya da daha fazlasını tercih edebilir. Burada önemli olan, tüm analizlerde olduğu gibi kullanılan sarf malzemesinin kalitesidir.

Membran filtre sıvı besiyerine de ilave edilebilir. 250 mL dere suyunda *Salmonella* olup olmadığının araştırılmasında en pratik yol 250 mL dere suyunu filtre edip filtreyi olduğu gibi standart yöntemle hazırlanmış ön zenginleştirme besiyerine (tamponlanmış peptonlu su) atmaktır. Standart analizlerden farklı olarak bu uygulamada 225 mL besiyerine gerek yoktur. ~40-50 mL besiyeri yeterlidir.

Kayısı suyu gibi partiküllü numunelerin membran filtrasyon ile analizinde selülozik ve proteolitik enzimler kullanılarak membran filtreden geçirilmesi mümkün ise de bu uygulamanın gıda sanayisinde uygulanması söz konusu değildir. Bunun nedeni enzimin etkili olması için belirli bir sıcaklıkta, belirli bir süre tutulması zorunluluğudur. Bu süre içinde, eğer varsa numune içindeki mikroorganizma sayısı artar ve gerçek sayı elde edilemez. Hedef mikroorganizmanın zaten 0 sayıda bulunması koşulunda bu yöntem geçerli görülse de kullanılacak enzimin de uygulama öncesi sterilize edilmesi gibi ek işlemler vardır.

Ön filtre uygulamasında homojenizat ya da sıvı gıda numunesi asıl filtrenin üzerine yerleştirilen 8 µm porlu filtreden geçirilip kaba parçalar burada tutulur ve 0,45 µm olan asıl filtrenin tıkanmasının önlenmesi amaçlanır. Bu uygulama da gıda sanayisinde fazlaca kabul görmemiştir, çünkü 8 µm porlu filtrede tutulan, ancak 0,45 µm'den daha yüksek çapa sahip parçacıklar (partiküller) 0,45 µm porlu filtreyi küçük bir hacmin filtrasyonu sonunda tıkamaktadır. Eğer ön filtrasyon uygulanıyorsa ön filtre de ayrı bir besiyerine yerleştirilmeli ve burada gelişen koloniler de sayılarak 0,45 µm porlu filtrede elde edilen koloni sayısına eklenmelidir.

08.03.02. 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 ºC'ta 20 dakika iken kimyasal dezenfeksiyon uygulanırsa dezenfektanın kolaylıkla sistemden uzaklaştırılması gerekir. Aksi halde sistemde kalan dezenfektan analizi yapılacak mikroorganizma üzerinde olumsuz etki oluşturur. Süzme gövdesinin Bunsen beki alevi ile sterilizasyonu da mümkündür, ancak aşırı alev uygulaması zamanla paslanmaz çelik gövdeye zarar verebilir. Ayrıca bu uygulama laboratuvar kazalarına neden olabilmektedir. Tek kullanımlık steril plastik gövdeler de vardır. Bu tek kullanımlık plastik gövdelerin bazı modelleri otoklavda sterilize edilerek yeniden kullanılabilmektedir.

-Süzme başlığının (gövdesinin/ hunisinin) sterilizasyonu için alkol kullanılıyor ise alkol uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısmının yakılarak giderilmesine ek olarak analiz öncesinde 500 mL kadar steril damıtık suyun filtre edilmesi, sistemde kalabilen dezenfektanın yıkanması için etkili bir uygulamadır.

-Aseptik koşullara uyularak filtrenin yerleştirileceği taban ~1-2 mL steril saf su ile ıslatılır ve filtre buraya yerleştirilir. Koruyucu plastik tabaka kendiliğinden kalkar ve bu kısım filtreden ayrılır. Sonra süzme başlığı yerine takılır. Membran filtreyi otomatik olarak veren cihazlarda koruyucu tabaka yoktur.

-Beklenen ya da hedef sayıya uygun miktarda sıvı hazneye konulur, pompa çalıştırılır ve sıvı numune membran filtreden geçirilir.

-Amaca göre 1 mL gibi küçük hacimlerin filtrasyonu gerekiyorsa süzme başlığına önce 40-50 mL kadar steril saf su konulur. Bu miktar önemli değildir, çünkü sadece numuneyi taşıma amacıyla kullanılan steril sudur.

-Süzme işlemi tamamlandıktan sonra çeperlerde kalmış olması muhtemel mikroorganizmaların da alınması için süzme başlığı en az 10-20 mL kadar steril saf su ile yıkanır. İlave steril su geçirme işlemi klor gibi inhibitör maddelerin varlığında daha da önemlidir.

-Filtrenin mikroorganizmaların tutulmuş olduğu yüzeyi üstte kalacak şekilde Petri kutusundaki amaca uygun besiyerine yerleştirilir. Petri kutuları tabanları alta gelecek şekilde inkübasyona bırakılır. Çeşitli standartlarda Petri kutularının kapağı üzerine inkübasyonu önerilmekle birlikte filtrenin ve/veya ped ile beraber filtrenin kapağa düşme riski vardır.

-İnkübasyon sonunda membran filtre üzerinde oluşan koloniler sayılır. Petri kutuları otoklavda ya da kimyasal uygulaması ile sterilize edilir ve sonra yıkanır ya da atılır. Kimyasal madde ile dezenfeksiyon uygulanacaksa üretici firma talimatına uyulmalıdır. Ev tipi çamaşır suyu da etkin bir kimyasal dezenfeksiyon için kullanılabilir. Ticari olarak pazarlanan çamaşır sularında sodyum hipoklorit derişimi genellikle %5'tir (50.000 ppm). Çamaşır suyu kullanılarak 500 ppm (1:100 seyrelti) olarak hazırlanan çözeltide kullanılmış tüm malzeme tam ıslanacak şekilde bir gece bekletildiğinde sporlu bakteriler dâhil olmak üzere gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren tüm mikroorganizmalar yok edilmiş olur.

08.03.03. Membran Filtrasyon Yönteminde Seyreltme

Her ne kadar membran filtrasyon yöntemi, prensip olarak standart EMS yöntemi ile sayılamayacak kadar düşük sayıda mikroorganizma içeren numuneler için uygunsa da pek çok su mikrobiyolojisi laboratuvarında yeterli alet ve ekipman bulunmaması nedeniyle yayma plak yöntemi ile sayılabilecek kadar yüksek sayıda mikroorganizma içeren numunelerin de bu yöntemle analiz edildiğine sıklıkla rastlanmaktadır.

Basit bir örnekle, 07.03.2013 tarih ve 28580 sayılı Resmî Gazetede yayımlanmış "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik", piyasada satılan ambalajlı sulardan alınan numunede 22 °C'ta koloni sayısının 1000 KOB/mL altında olmasını göstermektedir. Standart bir membran filtre çapı 45-50 mm kadar olup bu alanda sağlıklı sayım için en çok 50 koloni olmalıdır. Bu durumda su numunesinin standart yöntemle seyreltilerek analize alınması gerekmektedir.

Membran filtrasyonda seyreltme kavramı ile yıkama/ taşıma amacıyla kullanılan steril saf su kavramı karıştırılmamalıdır.

Suda tam olarak eriyebilen katı gıdalarda da homojenizasyon bir anlamda zorunlu bir seyreltme uygulamasıdır.

Sıvı numunede beklenen ya da izin verilen sayı 20 KOB/ mL kadar ise 1 mL numunenin filtre edilmesi yeterlidir. Matematik olarak bakıldığında beklenen ya da izin verilen sayı 200 KOB/ mL ise bu kez 0,1 mL numune filtre edilmelidir. Kuşkusuz, 10^{-1} seyreltiden 1 mL numune de analize alınabilir, ancak doğrudan 0,1 mL numunenin kullanılması çok daha pratiktir.

1 mL su numunesi filtrasyon gövdesine doğrudan aktarılıp filtrasyon yapılamaz. Bu amaçla önce 40-50 mL kadar steril saf su filtrasyon gövdesine aktarılır, üzerine 1 mL numune ilave edilir ve süzme başlatılır.

Burada 40-50 mL steril saf suyun miktarı önemli değildir, çünkü bu saf su seyreltme değil bir anlamda numunenin sağlıklı filtrasyonu için taşıma görevi yapmaktadır. Sonuç olarak numuneden 1 mL analize alınmıştır ve inkübasyon sonrası elde edilen koloni sayısı doğrudan kullanılır.

0,1 mL su numunesi için de benzer uygulama yapılabilir, ancak daha az miktarlarda numunenin filtrasyonu gerekli ise standart seyreltme yapılmalıdır.

Örnek: Numunede 2000 KOB/ mL mezofil aerop bakteri olduğu tahmin edilmektedir. Standart yöntemle 10^{-2} seyrelti elde edilir, buradan alınacak 1 mL numune içinde 40-50 mL kadar steril saf su bulunan filtrasyon (süzme) gövdesine (hunisine/ başlığına) aktarılır ve işlem devam eder. İnkübasyon sonunda elde edilen koloni sayısı 100 ile çarpılarak numunedeki sayı hesaplanır. Bunun gibi sayının sadece tahmin edildiği numunelerin analizinde bir alt ve bir üst seyreltilerden de ekim yapılması, bir diğer deyiş ile bu örnekte 10^{-2} yanında 10^{-1} ve 10^{-3} seyreltilerden de ekim yapılması önerilir. Analize en seyreltik olan 10^{-3} seyreltiden başlanıp 10^{-2} ve 10^{-1} ile devam edilmesi durumunda filtrasyon gövdesinin her defa sterilize edilmesi gerekmez.

08.03.04. Membran Filtrasyon Yönteminde Sonuçların Verilmesi

Membran filtreden fiilen geçirilen miktar esas alınarak sonuçlar KOB/ mL ya da KOB/g olarak verilir. Aşağıda çeşitli örnekler verilmiştir:

-250 mL su numunesi filtre edilmiş ve sonuçta 24 koloni sayılmış ise sonuç 24 KOB/250 mL olarak verilir.

-5 g şeker 45 mL steril seyreltme çözeltisinde eritilmiş, buradan alınan 5 mL filtreden geçirilip inkübasyon sonrasında 17 koloni sayılmış ise filtrasyon öncesinde 10^{-1} seyreltme yapılmış demektir. Bu çözeltinin her mL'sinde 0,1 g ve 5 mL'sinde ise 0,5 g şeker vardır, yani fiilen süzülen miktar 0,5 g şekerdir. 17 koloni 0,5 g numuneden elde edildiğine göre sonuç 34 KOB/g olarak verilir.

-250 mL su numunesi filtre edilmiş ve koloni gelişmesi görülmemiş ise sonuç <1 KOB/250 mL olarak verilir. Yaygın uygulamada bu sonuç "yok/250 mL" olarak da verilmektedir.

-100 mL dere suyunda *Salmonella* aranması amacıyla yapılan filtrasyondan sonra filtre 50 mL kadar önzenginleştirme besiyerine atılıp buradan standart *Salmonella* analizi ile selektif zenginleştirme, selektif katı besiyeri, tipik kolonilerin tanımlama aşamaları ile numunede *Salmonella* var/yok testi yapılmış olur. Görüldüğü gibi burada membran filtrasyon tekniği bir anlamda var/ yok testinin bir bölümü olarak kullanılmaktadır.

08.04. Metabolizmaya Dayalı Sayımlar

Bu analizlerin temel mantığı mikroorganizmayı doğrudan saymak değil, oluşturduğu metabolitlerin miktarı üzerinden sayıyı tahmin etmektir.

Analiz edilen numunedeki mikroorganizma sayısı ne kadar yüksek ise oluşturulan metabolitlerin belirlenme süresi o denli kısa olur.

Metabolizmaya dayalı sayımlar çok basit olarak şu şekilde özetlenebilir: Camları ve kapıları tam izole edilmiş, hava girişi ve çıkışı olmayan bir odada bir grup insan olduğunu varsayalım. Kapılar ve pencereler tam izole edildiği zaman odadaki CO_2 miktarı ppm olarak ölçülür. İnsanların soluması sonunda bu odada giderek CO_2 miktarı artar. Ya örneğin, 2 saat sonra odadaki CO_2 miktarı ölçülür ya da odadaki CO_2 miktarının kaç saatte ilk ölçüme kıyasla değiştiği süre belirlenir. Kuşkusuz, başlangıçta söz konusu odada ne kadar fazla insan varsa CO_2 miktarı o denli hızlı artış gösterecektir. Daha önce az, orta ve yüksek sayıda insan bulunan odalarda insan sayısı ve CO_2 birikimi belirlenir ve grafik haline getirilir. Doğal olarak, en azından odadaki insanların yaşlarına bağlı olarak soluma miktarları farklı olacaktır. Dolayısı ile sağlıklı bir tahmin yapabilmek için önceden az, orta ve yüksek sayıda insan bulunan odalarda yeteri kadar deneme sonucu veri tabanına girilmiş olmalıdır. Mikrobiyel analizlerde bu sayı en az 25 olarak kabul edilir.

Metabolizmaya dayalı analizlerin temel avantajları arasında daha yüksek sayıda gıda numunesi ile çalışmak, yani otomasyona bağlı olarak çok sayıda numuneyi analiz etmek vardır. Ancak asıl avantaj, eğer yoğun bir bulaşma varsa bunu koloni oluşma süresinden daha önce belirlemektir. Örneğin, koliform grup bakteriler 14-16 saat içinde gözle ya da büyüteç ile görülebilecek büyüklükte mikrokoloni oluştururlar. Analiz edilecek numunede yoğun bir koliform grup bakteri bulaşması varsa ve kullanılan yöntem bu bulaşmayı 14-16 saate kıyasla çok daha önce belirleyebiliyorsa kullanılan yöntem amacına ulaşmıştır. Analiz yapılan numunede sadece 10-15 KOB/ g-mL düzeyinde koliform grup bakteri bulaşması varsa ve kullanılan yöntem 24 saatten daha uzun sürede bunu belirleyebiliyorsa yöntem, hızlı analiz amacına erişemez.

Metabolizmaya dayalı tüm sayımlar, sonucu tahmini değer olarak verir. Çünkü popülasyonda bulunan mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri cins, tür ve hatta suş bazında farklı olabilir. (A) gıda numunesine (X) sayıda metabolik aktivitesi yüksek türlerin ağırlıklı olduğu mikroorganizma türü ile bulaşmış olduğunu varsayalım. (B) gıda numunesi ise yine (X) olmak üzere aynı sayıda, ancak düşük metabolik aktiviteli türlerin ağırlıklı olduğu mikroorganizma türü ile bulaşmış olsun. Metabolizmaya dayalı analiz sonunda her ikisi de aynı sayıda mikroorganizma içermesine karşın (A) numunesinde (B) numunesine kıyasla daha kısa sürede oluşan metabolit belirleneceği için sanki daha fazla sayıda mikroorganizma varmış gibi sonuç verilecektir. Bu sorunu olabildiğince azaltmak için aşağıda belirtildiği gibi en az 25 numunenin analiz sonucu sisteme kaydedilmelidir.

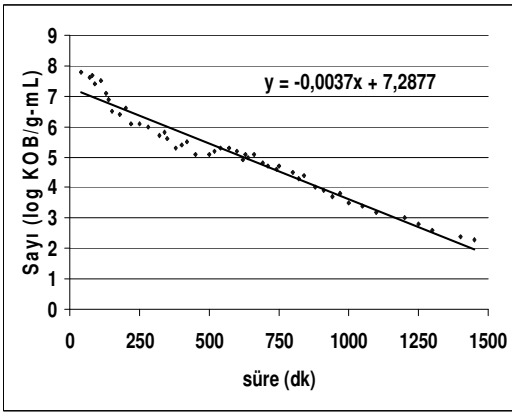
08.04.01. Empedans (Kondüktans) Ölçümü

Metabolizmaya dayalı sayımlar içinde en yaygın kullanılan yöntemdir. Her çözeltinin bir elektrik geçirgenliği vardır. Besiyerine gıda maddesi ilave edildiğinde bu geçirgenlik ölçülür.

İnkübasyon boyunca gelişen mikroorganizmalar gerek büyük molekülleri parçalamaları gerek metabolitleri ortama salgılamaları sonunda bir anlamda ortamın kimyasal yapısını değiştirirler ve elektrik geçirgenliğinde değişiklik olur. Bu değişiklik süresi ne kadar kısa ise o kadar çok mikroorganizma olduğu anlaşılır. Değişikliğin belirlendiği süre, yanıt ya da sinyal süresi olarak anılır. Empedans (kondüktans) yöntemi uygulamasında selektif besiyerleri kullanılarak, örneğin sadece koliform grup bakterilerin ya da laktobasillerin sayılması da mümkündür. Ayrıca yapılan işlem sadece besiyerine gıdayı ekleyip gerekirse homojenize ettikten sonra bu numuneyi özel kaplara aktararak cihazın inkübasyon haznesine yerleştirmektir. Böylece çok sayıda numune analize alınabilir. Homojenizata daldırılmış özel elektrotlar ile başlangıç elektrik geçirgenliği cihazın bağlı olduğu bilgisayara kaydedilir. Geçirgenlikte değişiklik olduğu anda bu süre belirlenir.

Yöntemin direkt ve endirekt uygulamaları vardır. Direkt uygulamada elektrotlar besiyeri + gıda homojenizatına daldırılır ve doğrudan buradaki geçirgenlik farkı belirlenir. Endirekt uygulamada ise elektrotlar NaOH + agar olan bir karışıma daldırılır. Metabolizmaya bağlı olarak oluşan CO_2, bu karışımın pH'sını ve dolayısı ile elektrik geçirgenliğini dolaylı olarak etkiler.

Sistemin kullanılması için önce farklı sayılarda mikroorganizma içeren numunelerde standart kültürel sayım yapılır ve aynı numunede yanıt süresi ölçülür. Bu sonuçlar cihazın bağlı bulunduğu bilgisayara kaydedilebileceği gibi basitçe bir Excel dosyasına kaydedilip Şekil 08.07'de verildiği gibi grafik elde edilerek formül hesaplanabilir. Cihaz kullanılmaya başlandığında hafızasına kaydedilmiş değerlere göre sayıyı kendisi verebilir ya da şekilde görülen formüle göre sayı belirlenebilir.



Şekil 08.07. Metabolizmaya Dayalı Sayım Örneği

Şekil 08.07'deki örnekte analiz (elektrik geçirgenliğinde değişme ya da yanıt) süresi 610 dk ise;

y= [(-0,0037 x 610) + 7,2877]= 5,0307 ≈ 5,0 log KOB/ g olarak hesaplanabilir.

Sistemin verimli kullanılması için önceden en az 25 kaydın (sayı ve süre) yüklenmesi ya da yukarıdaki grafiğin en az 25 numune ile hazırlanması gerekir. Bu analizlerde sağlıklı bir grafik elde etmek için farklı sayılarda mikroorganizma içeren numuneler kullanılmalıdır. Devamında işletme tarafından belirlenecek belirli sürelerle (örneğin ayda bir olmak üzere) standart yöntemle koloni sayısı belirlenmeli ve aynı numunede ölçülen yanıt süresi kontrol edilmelidir.

Oldukça gelişmiş ve modern cihazlarla yapılan bu analizde üzerinde durulması gereken en önemli noktalardan birisi, elektrotların üretici firma tarafından önerilen sürede bakımlarının yapılmasıdır. Bu bakımlar yapılmazsa oksitlenmeye bağlı olarak sinyal alınamaz ve analiz numunesinde mikroorganizma olmadığı şeklinde sonuç alınır.

08.04.02. Metilen Mavisi ve Resazurin İndirgeme Testi

Çiğ sütteki bakteri yükünü hızlı bir şekilde belirlemek için kullanılan indirgeme testleridir. 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 olmak üzere 37 ^{o}C'ta inkübasyona bırakılır. Sütte bulunan bakterilerin gelişmesi sonunda mavi renkli boya indirgenip renksiz olur ve süt orijinal 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 kalitelerde olan çiğ sütlere metilen mavisi indirgeme testi uygulanır ve indirgeme süresi belirlenip buna paralel olarak aynı çiğ süt numunelerinde standart yöntemle toplam mezofil aerop bakteri sayımı yapılır. Sayım sonuçlarının logaritması metilen mavisi indirgeme süresine göre şekil 08.07'de verilen örneğe uygun grafik haline getirilir. Grafiği güvenilir bir şekilde elde etmek için önerilen en düşük sayı, yine 25'tir.

Resazurin indirgemeye bağlı bakteri sayımı da bu şekilde yapılır.

Metilen mavisi indirgeme vb. metabolizmaya dayalı tüm hızlı testler üzerinde temel sakınca, popülasyondaki bakterilerin metabolik aktivite farkıdır. Analizi yapılan numunede 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.

Çiğ sütte antibiyotik vb. maddeler varsa bakteri sayısı yüksek olmasına karşın indirgeme süresi uzar ve yanıltıcı sonuçlar alınır. Dolayısı ile indirgeme testleri sadece antibiyotik vb. mikroorganizma gelişmesini baskılayacak maddeler olmayan çiğ sütlerde uygulanabilir.

Metilen mavisi ve resazurin indirgeme testinin süt sanayisinde önemi kalmamıştır çünkü ~10^6 KOB/mL bakteri içeren düşük kaliteli sütte indirgeme süresi ~2 saattir ve sanayide çiğ sütün bu süre ile analiz için bekletilmesi söz konusu değildir. Bu kitapta bu analizin anlatılma nedeni okuyucuya metabolizmaya dayalı sayımlar üzerinde farklı örnek vermektir.

08.04.03. Durham Tüpü ile Gaz Çıkış Süresinin Ölçülmesi

Özellikle salça sanayisinde yoğun laktobasil bulaşısının erken belirlenmesi için uygundur. Yöntem 04.03.04. Özel Uygulamalar bölümünün Durham tüpü olan besiyerleri kısmında (Şekil 04.03) açıklanmıştır. Metabolizmaya dayalı bu analizin avantajları 5 g salça numunesi ile çalışılması ve yoğun laktobasil bulaşması varsa Petri kutusunda koloni görülmesinden önce bu bulaşmanın saptanabilmesidir. Sadece salçada laktobasil değil, farklı gıdalarda amaca uygun selektif besiyeri kullanılarak maya ve koliform grup bakteri analizi de yapılabilir. *Bacillus* cinsinin bazı türleri (düz ekşime yapanlar) sıvı besiyerinde gaz oluşturmadan gelişirler. Bu nedenle bu yöntem basil için uygun değildir.

08.05. Mikroskobik Sayımlar

Mikroskobik sayımların ~5 dk içinde sonuç alınabilmesi ve kültürel yöntemlerle kıyaslandığında maliyetinin yok denilecek kadar düşük olması gibi çok önemli 2 üstünlüğü olmasına rağmen 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, bira ve ekmek yapımı gibi kısıtlı numunelerde maya sayımında kullanılmaktadır. Sütte Breed yöntemi ile yapılan direkt mikroskobik sayım sütün genel kalitesi hakkında bilgi verir.

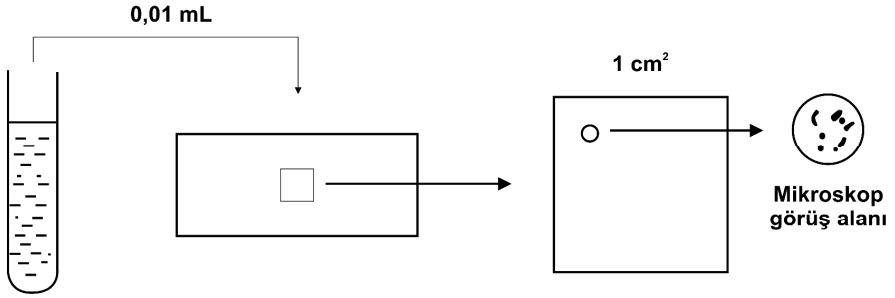
Aşağıda temel mikroskobik sayımlar verilmiştir.

08.05.01. 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 sonucun yüksek ya da düşük olması sütün kalitesi hakkında oldukça iyi bir fikir verir.

Yöntemin esası, Şekil 08.08'de şematik olarak verilmiştir. Buna göre 0,01 mL çiğ süt bir şablon yardımı ile belirlenmiş 1 cm^2 alana yayılır, kurutulur ve boyandıktan sonra mikroskopta incelenir. Görüş sahası çapı objektif mikrometre yardımı ile ölçülür ve görüş alanı hesaplanır. Sonra 1 cm^2 alanda kaç adet mikroskop görüş alanı olduğu basitçe hesaplanır ve bu değer "mikroskop faktörü" olarak kaydedilir. 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 faktör, mikroskobun objektifi, oküleri ve bazı mikroskoplarda olduğu gibi tüp boyu değiştirilmezse sabit kalır. Bu sınırların dışında bir değer elde edilirse nedeni araştırılmalı ve düzeltici faaliyet olarak kayıtlara geçilmelidir. Herhangi bir nedenden ötürü mikroskop faktörü bilinmiyorsa 4000 olarak kabul edilir, ancak bu durumda analiz sonucu "tahmin" olarak verilir.



Şekil 08.08. Breed Yönteminin Uygulanışı

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 x MF x 100 formülü ile elde edilir. Burada A ortalama bakteri sayısı, MF mikroskop faktörü ve 100 ise 0,01 mL'yi 1 mL'ye çevirmek içindir.

Breed yönteminin uygulanışında termal değil kimyasal fiksasyon yapılır. Bu amaçla 0,01 mL çiğ süt numunesi lam üzerinde 1 cm^2 alana yayıldıktan ve kurutulduktan sonra lam, içinde ksilol bulunan bir behere daldırılarak 60 sn beklenir. Ksilol, süt yağını eriterek mikroskobik görüntünün daha temiz olmasını sağlaması yanında bakterilerin suyunu çekerek lama yapışmasını sağlar (fiksasyon). Bu süre sonunda lam, içinde %76'lık alkol olan bir behere daldırılıp yine 60 saniye bekletilir. Alkol, ksilolün lamdan uzaklaşmasını sağlar. Sonra lam yavaşça su ile yıkanarak alkol uzaklaştırılır ve metilen mavisi ile 30 saniye boyanır, su ile yavaşça yıkanır, kurutulur, sedir yağı damlatılıp 100x (immersiyon) objektifte incelenir.

Breed yöntemi ile çiğ sütte toplam bakteri[3] yükü belirlenebilir. Mikroskobik sayımların en büyük dezavantajı bazı özel uygulamalar hariç tutulmak kaydıyla canlı ve ölü hücre sayısının ayırt edilememesidir. Eğer işletmeye gelen antibiyotiksiz çiğ süt, daha önce bir ısıl işlem görmedi ise mikroskopta görülenlerin tümü canlı olarak kabul edilebilir. Çünkü bu nitelikteki süt, bakteriler için iyi bir gelişme ortamıdır. Soğutma, öldürücü değildir. Breed yöntemi ile yapılan sayımda tüm hücreler canlı olarak kabul edilse dahi bunların tüm aerop, anaerop, psikrofil, mezofil ve termofil bakteri sayısını vereceği gözden uzak tutulmamalıdır.

Bu sayım yöntemi, işletmeye gelen sütün kabul ya da reddi yanında, eğer süt işletmeye kabul edilirse sütün hangi ürüne işleneceği (pastörize içme sütü, yoğurt, peynir vb.) konusunda da yönlendirici olabilir. Bu yönlendirmelere ilişkin yorumlar, bu kitabın içeriği dışındadır.

08.05.02. Howard Lamı/ Lameli

Başta domates, şeftali ve kayısı ürünleri olmak üzere işlenmiş gıdalarda ham madde kalitesi hakkında bilgi veren ve özellikle ticarette halen çok geçerli olan bir yöntemdir. Analiz, 25 görüş sahası olan özel bir lam ve lamel ile yapılır. Amaç incelenen görüş sahasının küf miselleri açısından (+) ya da (–) olarak değerlendirilmesi ve buna göre analiz edilen numunede küflü saha oranının belirlenmesidir. Sonuçlar "% küflü" saha olarak verilir.

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 08.09'da domates ve küf doku örnekleri verilmiştir.

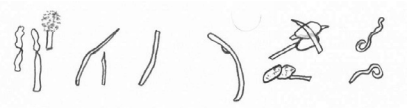
Eğer saha içinde 3'ten daha fazla küf flamenti varsa ya da 3'ten daha az sayıdaki flamentlerin uzunluğu görüş sahası çapının 1/6'sından daha fazla ise bu görüş sahası pozitif olarak değerlendirilir.

Sayım için özel bir lam ve lamel kullanılır. Bu lam/ lamelde inceleme 1,5 mm^2 görüş alanında yapılır. Yaklaşık toplam 100 büyütme gücü ile bu alan görülebilir. Lamın derinliği 0,1 mm'dir ve bu şekilde tam 0,15 mm^3 hacim incelenmiş olur. Objektif mikrometre kullanılarak ve kimi mikroskoplarda olan tüp boyu ayarlanarak tam 1,5 mm^2 alan incelemesi sağlanabilirse de günümüzde kullanılan mikroskopların çoğunda tüp boyu ayarı yoktur. Dolayısı ile numune özel lama aktarılır ve üzerine her biri 1,5 mm^2 olmak üzere 25 adet görüş sahası olan özel lamel kapatılarak inceleme yapılır.

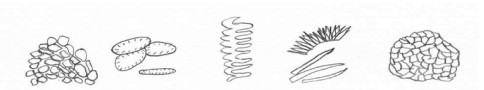
[3] Tüm aerop, anaerop, psikrofil, mezofil, termofil bakteri sayısı

Eşit koyulukta paralel duvarlar, iki ucu kapalı ya da bir ucu yuvarlak son, dallanma, granüllü ve septalı yapılar küf dokularıdır:

Buna karşın üreme hifleri sivri uç, eşit koyulukta olmayan duvarlar, yumrulu duvar, eğri ve keskin eğri yapılar domatesten gelen dokulardır:



Tipik küf yapıları



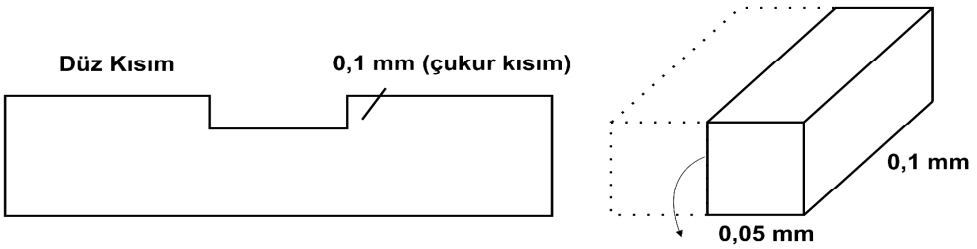
Tipik domates yapıları

Şekil 08.09. Howard Lamı/ Lameli için Tipik Domates ve Küf Görüntüleri

08.05.03. Thoma Lamı

Hemositometre adı ile de bilinen özel bir lam aracılığı ile gıda mikrobiyolojisinde maya, klinik laboratuvarlarda sperm ve kan sayımlarında kullanılan bir yöntemdir. Lam üzerinde özel bölmeye sıvı konulup lam kapatıldığında bu bölmede tam olarak 0,1 mm^3 hacim kalır. Sayım, 20x ya da 40x objektif kullanılarak bu bölmede yapılır.

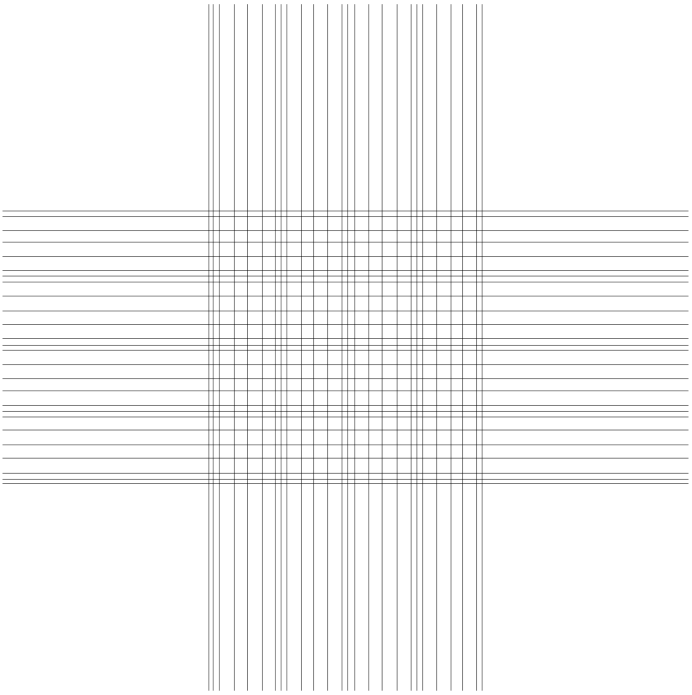
Thoma lamındaki 0,1 mm^3 hacim kenarları 0,05 x 0,05 mm ve derinliği 0,1 mm olan ve 20 x 20 şeklinde yerleştirilmiş 400 küçük kare prizmadan oluşur. Bu kare prizmalar çok genel olarak "kare" adıyla anılır. Sayım kolaylığı açısından 400 küçük kare 16 büyük kareye bölünmüştür. Şekil 08.10'da Thoma lamı ve küçük kare (kare prizma) gösterilmiştir.



Şekil 08.10. Thoma lamı ve küçük kare

Sayım sonucu, A x SF x 10.000 formülü ile elde edilir. Burada A 0,1 mm^3 hacimde sayılan maya, SF yapıldı ise seyreltme faktörü ve 10.000 ise 0,1 mm^3 hacimde elde edilen değeri 1 mL'ye çevirmek için kullanılan sabittir.

Sayım kolaylığı olması açısından, 400 küçük karenin 16 büyük kare içinde toplanma yöntemi çoğu kez yanılgıya neden olmaktadır. Şekil 08.11'de Thoma lamında 400 küçük kare ve ara çizgiler ile belirlenen 16 büyük kare sınırları gösterilmiştir.

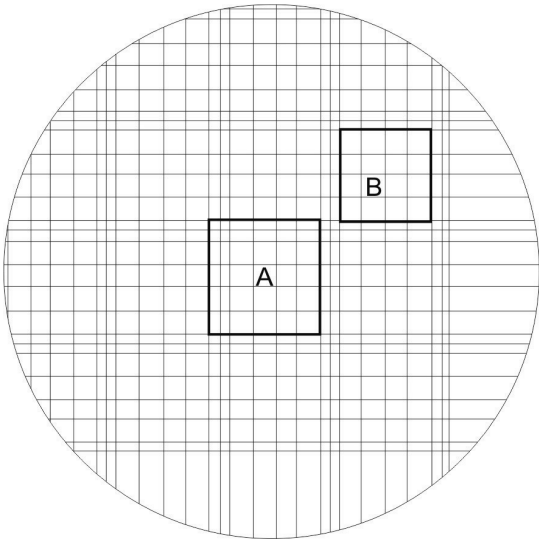


Şekil 08.11. Thoma lamında 16 büyük kare sınırı

Buradaki örneğe göre, düşey eksende ara çizgi en soldaki düşey çizginin hemen sağından geçmektedir. Buna göre, düşey eksende ara çizgilerin ilk solundaki düşey çizgiler, büyük karelerin düşey sınırını göstermektedir. Benzer şekilde yatay eksende ara çizgi, en alttaki yatay çizginin hemen üzerinden geçmektedir. Buna göre, yatay eksende ara çizgilerin altındaki çizgiler büyük karenin yatay sınırlarını göstermektedir.

Bu şekilde büyük kare tanımlamasının kolaylıkla anlaşılamayacağı açıktır. Bunun yerine alternatif büyük kare tanımlaması şöyle yapılabilir:

Yatay ve düşey eksenlerdeki ara çizgiler alternatif büyük kare sınırı olarak kabul edilir. Sonuçta 16 x 25= 400 küçük kare yerine, bu alternatif yöntemde 16 x 16= 256 küçük karede sayım yapılmış olacağına göre sayım sonucu 400/ 256= 1,5625 ile çarpılarak 400 küçük kareye çevrilmiş olur. Şekil 08.12'de bu şekilde alternatif büyük kare sınırları gösterilmiştir.



Şekil 08.12. Thoma lamında alternatif büyük kare sınırı (A: 25 küçük kare; B: x 1,5625 olan 16 küçük kare)

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde Thoma lamı ile sayım sadece maya hücreleri için yapılır. Bunun nedeni 20x ya da 40x objektif kullanıldığında mikroskop görüş derinliğinde sadece mayaların görülebilmesidir. Bakteriler 20x ya da 40x objektiflerle görülemez. 100x objektif kullanılırsa 0,1 mm olan görüş derinliğinde bakterilerin görülmesi 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 netlik derinliğinin daha kesin olmasına bağlı olarak maya sayımı daha kolay yapılır.

Thoma lamında sayım sırasında canlı maya hücreleri boyanmaz. Basit preparat tekniği ile sayım yapılır. 10 mL 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. Mikroskopta mavi boyalı ve renksiz hücrelerin ayrımı deneyim gerektirir.

08.05.04. Direkt Epifloresan Filtre Tekniği (DEFT)

1980'li yıllardan beri uygulanan DEFT (Direct Epifluoresance Filter Technique) yönteminde gıda numunesi bir seri işlemle analize hazırlanır, membran filtreden geçirilip fluorokrom boyalar ile boyanır ve epifloresan (epifluoresance)

mikroskop ile incelenir. Filtrenin uygun bir katı besiyerinde 3-6 saat inkübasyonu sonunda boyanıp incelenmesi ise mikrokoloni DEFT olarak tanımlanır ve bu yöntemde sadece mikrokoloniler sayılacağı için numunedeki 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.

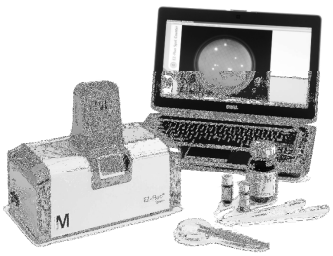
DEFT'in en büyük avantajlarından birisi filtreden geçirilmeye bağlı olarak az sayıda mikroorganizma içeren numunelerde de sayımın güvenilir olmasıdır.

DEFT uygulamasında sayım yapılacak numune, membran filtreden geçirilir ve acridine orange ile boyanıp epifloresan mikroskobunda incelenir. Canlı hücreler portakal-kırmızı-sarı-kahverenginde boyanırken ölü hücreler yeşil floresan verir. Bu şekilde canlı ve ölü hücre ayrıldığı için kültürel yöntemle kıyaslanmayacak kadar kısa sürede sayım sonucu elde edilebilir. Yöntemin temel dezavantajları operatörün deneyimli olması gerektiği ve sayım yapılacak numunenin membran filtreden geçirilebilme özelliğinde olmasıdır. Ayrıca acridine orange boyası mutajenik özellikte olduğu için çalışılırken özel önlem almak gerekir. Florojen antikorlar ile DEFT kombine edilerek belirli bir mikroorganizmanın (örneğin *E. coli* O157) sayımı ya da zenginleştirme kültüründe var/yok analizi için çalışmalar sürdürülmekte ise de yöntemin uygulamadaki dezavantajları bu araştırmaların yoğunluğunu olumsuz yönde etkilemektedir.

08.06. Membran Filtrasyon/ Floresan Boyama Entegrasyonu

Mikrobiyolojik analizlerin en büyük sorunlardan birisi uzun analiz süresidir. Başta polimeraz zincir reaksiyonu (PZR; PCR) olmak üzere çeşitli yeni yöntemler analiz süresini kısaltmak için mikrobiyoloji laboratuvarlarında giderek daha fazla yer almaktadır.

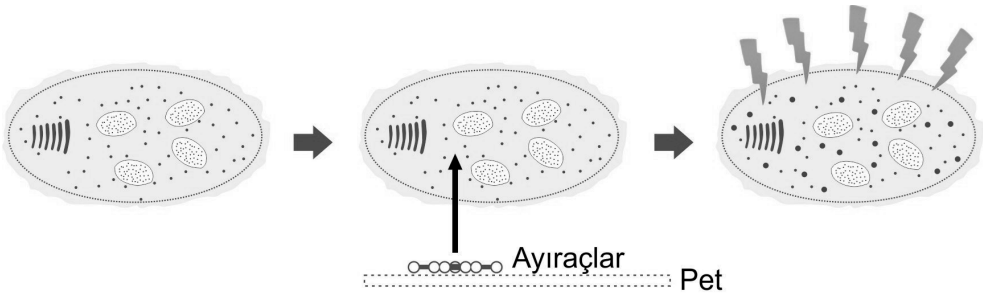
Membran filtrasyon/ floresan boyama entegrasyonu olan yeni bir sistem (EZ Fluo), analiz süresini önemli ölçüde kısaltan hızlı analiz yöntemidir. Sadece membran filtreden geçirilebilir numuneler için kullanılmaktadır. Filtrasyon sonrasında filtre, amaca uygun bir katı besiyerine yerleştirilip standart sürenin 1/3'ü kadar süre ile inkübe edilir (şekil 08.13).



Şekil 08.13. EZ Fluo

Bu süre sonunda filtre, floresan boya ile ıslatılmış başka bir Petri kutusuna yerleştirilip 30 dk inkübe edilir ve bu Petri kutusu, özel cihaza yerleştirilip floresan ışıma kontrolü yapılır. İstenirse görüntü bilgisayara kaydedilebilir.

Bu sistemde gözle görülebilir koloni oluşmadan çok önce floresan veren hücrelerin sayılması mümkündür. Floresan boya içeren ayıraç başlangıçta floresan ışıma vermez, fakat yaşayan hücrelerde metabolizmanın bir bölümünde etkin olan hücre içi bir enzim, floroforu serbest bırakmak için substratı parçalar. Florofor, hücre içinde biriktiğinde sinyal doğal olarak güçlenir. Okuyucu cihaz içindeki hücreler floresan boyanın uyarıcı dalga boyuna maruz kalır, böylece hücreler görsel olarak sayılabilir hale gelirler. Bu floresans, çıplak gözle görülebilen kolonilerden çok daha küçük kolonilerin görülmesini sağlar. Şekil 08.14.'de floresan boyamanın prensibi verilmiştir.



Boyamadan önce bakteri | Boyama pedi üzerinde membran inkübasyonu (30 dakika) | Boyanmış Bakteri

Şekil 08.14. Floresan boyamanın prensibi

Sistemin en büyük iki avantajı bulaşmanın hızlı olarak belirlenmesi ve kullanılan floresan boyanın hücreye zarar vermemesidir.

Yapılan çalışmalar koliform grubu bakterilerin 8-10 saat ve küflerin 20-32 saat içinde belirlenebildiğini göstermiştir. Gıda sanayisi için bu inkübasyon süreleri yeterince kısadır.

Floresan boyanın hücreye zarar vermemesi, floresan ışıma vermeyen Petri kutusundaki filtrenin yine amaca uygun bir katı besiyerine aktarılıp inkübasyona devam edilmesi ve numunenin örneğin 2 saat sonra yeniden boyama yapılarak incelenmesine olanak sağlar. Floresan ışıma görülürse filtre aynı şekilde katı besiyerine yerleştirilip koloni izolasyonuna yetecek kadar süre ile inkübasyona devam edilir. Sonra örneğin, VRB agarda gelişen kolonin hangi bakteriye ait olduğu belirlenebilir.

Bu yöntemin bugün için en büyük dezavantajı VRB agar gibi selektif bir besiyeri kullanılsa dahi tüm *Enterobacteriaceae* üyelerinin sinyal vermesidir. Bir diğer deyiş ile örneğin 250 mL içme suyu numunesinde sadece koliform grup bakteri

olmaması isteniyorsa, ancak koliform grup bakteri dışındaki *Enterobacteriaceae* üyeleri için bir limit yoksa ve 12 saat inkübasyon sonunda sinyal alınırsa (floresan ışıma yapan hücreler tespit edilirse) bu hücrelerin hangi bakteri cinslerine ait olduğu tahmin edilemez. Kesin olan tek bulgu VRB agarda gelişebilen herhangi bir bakterinin varlığıdır. VRB agar, ayırt edici selektif bir katı besiyeridir. Koliform bakteriler 37 ºC'ta 24 saat inkübasyon sonunda koyu kırmızı renkli koloniler oluştururlar, ancak koliform grup olmayan (laktoz negatif) tüm *Enterobacteriaceae* üyeleri de VRB agarda kolaylıkla gelişip renksiz koloni meydana getirirler. VRB agarda gelişen koyu kırmızı ya da renksiz koloniler göz ile çok kolay şekilde ayırt edilebilir, ancak bu sistemde tümü aynı floresan ışıma verir.

Yakın bir gelecekte mikroorganizma türüne, cinsine, familyaya özel floresan boyaların geliştirileceği beklenmektedir.

Membran filtrasyon/ floresan boyama entegrasyonu olan bu yeni sistem ile;

-İçme suları, gazlı meşrubat vb. gıdalarda tüm *Enterobacteriaceae* üyeleri 0 KOB/250 mL olarak hedefleniyorsa 12 saat içinde var/yok olarak sonuç alınır.

-Gazlı meşrubatta yüksek asitlik direncine bağlı olarak canlı küf sporu kalmış olabilir. Standart analiz süresi olan 4 gün yerine 2 gün içinde var/yok olarak sonuç alınır.

-Klinik mikrobiyolojide serum gibi numunelerde daha kısa süre içinde var/yok olarak sonuç alınır.

-VRB agar 44 ºC'ta inkübe edilerek fekal bulaşma olup olmadığı 12 saat içinde var/yok olarak belirlenebilir.

Hatırlatma:

Büyük hacimli inkübatörlerde ve/veya yüksek sıcaklıklardaki inkübasyonlarda ve/veya uzun süreli inkübasyonlarda besiyeri yüzeyinin kuruması engellenmelidir. Özellikle selektif besiyerlerinde yüzey kuruması inhibitörlerin derişimini yükseltir ve sahte negatif sonuçlara neden olabilir.

Petri kutularının mutfak tipi strech filme sarılarak inkübasyona bırakılması bir çözümdür. Doymuş KCl çözeltisi olan bir beherin ya da bardağın inkübatöre bırakılması, inkübatörde sabit bağıl nem sağlar.

Hatırlatma:

Salmonella ve *E. coli* başta olmak üzere *Enterobacteriaceae* üyelerinin çoğunun doğal habitatı sıcak hayvanların bağırsak sistemleridir. Ancak memeli hayvanların ve kuşların bağırsak sistemlerinde mutlaka bu bakteriler olacak diye bir kural yoktur. Standart ya da gelişmiş analiz yöntemi ile tavuk dışkısından *Salmonella* izole edilmezse bunun doğal bir sonuç olabileceği unutulmamalıdır.

Hatırlatma:

Bir gıda numunesinde *E. coli* olmadığı halde *E. coli* dışında fekal koliformlar ve/veya *Salmonella* ve/veya *E. coli* O157:H7 serotipi gibi enterik patojenler bulunabilir. Dolayısı ile bir gıdada numunesinde hem *E. coli* hem de *Salmonella* analizi yapılıyorsa ve *Salmonella*'ya göre çok daha kısa sürede sonuç alınan *E. coli* sonucu negatif ise *Salmonella* analizine devam edilmelidir. En azından *Salmonella* analizinin 25 g(mL) numunede yapıldığı, ama *E. coli* için bu miktarın çok daha düşük olduğu göz ardı edilmemelidir.

Hatırlatma:

Bir gıda numunesinin standart analizinde Petri kutusundaki sayımlarda örneğin, 10^{-1} seyreltide 23 ve 30; 10^{-2} seyreltide 18 ve 22; 10^{-3} seyreltide 25 ve 40 koloni elde edilmişse analizde kullanılan malzemenin (Petri kutuları, besiyeri, seyreltme çözeltileri, alkol, pipet uçları vb.) steril olmadığı kesindir. Dolayısıyla sonuçlar tümüyle geçersizdir ve numunedeki mikroorganizma sayısı hakkında hiçbir koşulda yorum yapılamaz.

09. GIDALARDA BULUNAN MİKROORGANİZMALAR

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

09.01. Genel Bilgiler **309**
09.02. Saprofitler (Çürükçüller) ve Gıdaların Bozulması **313**
09.03. Patojenler ve Gıda Kaynaklı Mikrobiyel Hastalıklar **314**
09.03.01. Patojen ve Saprofit Ayrımı 314
09.03.02. Enfeksiyon ve İntoksikasyon 315
09.03.03. Mide Asitliği Faktörü 316
09.03.04. Hastalığa Yol Açan Patojen Sayısı 317
09.03.05. Risk Grupları 317
09.03.06. Gıda Kaynaklı Mikrobiyel Hastalık İstatistikleri 317
09.03.07. Gıda Kaynaklı Mikrobiyel Hastalık Etmeninin Saptanması 318
09.04. İndikatör Mikroorganizmalar **320**
09.04.01. Gıda Kalitesine Yönelik İndikatör Mikroorganizmalar 320
09.04.02. Gıda Güvenliği ile İlişkili İndikatör Mikroorganizmalar 321
09.05. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri **323**
09.06. Anaeroplar ve Mikroaerofiller **324**
09.07. Mayalar ve Küfler **325**
09.08. Toplam *Enterobacteriaceae* **327**
09.09. Koliformlar, Fekal Koliformlar ve *E. coli* **328**
09.10. Enteropatojenik *E. coli* Serotipleri **331**
09.11. *Salmonella* spp. **341**
09.12. *Clostridium botulinum* **351**
09.13. *Clostridium perfringens* **361**
09.14. *Listeria monocytogenes* **367**
09.15. *Staphylococcus aureus* **375**
09.16. *Campylobacter jejuni* **382**
09.17. *Vibrio parahaemolyticus* **385**
09.18. *Cronobacter sakazakii* **387**
09.19. *Bacillus cereus* **389**
09.20. *Shigella* spp. **391**
09.21. *Yersinia enterocolitica* **393**
09.22. Enterokoklar **396**
09.23. *Pseudomonas* spp. **397**
09.24. Diğer Saprofitler **398**
09.25. Diğer Patojenler **402**

09.01. Genel Bilgiler

Yeryüzünde kaç farklı türde mikroorganizma olduğu bilinmemekte, farklı kaynaklara göre 500.000-6.000.000 arasında farklı türde mikroorganizma olduğu tahmin edilmektedir. Yaklaşık 100 bin fungus türünün tanımlaması ve

sınıflandırılması yapılmış olmakla beraber yeryüzünde 1,5-5,0 milyon farklı fungus türü olduğu ve bunların ancak %5 kadarının bilindiği tahmin edilmektedir. Buna göre kimi kaynaklar en az 500 bin toplam mikroorganizma olduğunu tahmin ederken kimi kaynaklara göre sadece en az 1,5 milyon fungus türü vardır.

Bugüne kadar insan bağırsağında bulunan 400 kadar farklı tür belirlenmişse de tıbbi mikrobiyologlar 35 binden daha fazla bakteri türü olduğunu tahmin etmektedirler. Bir diğer deyiş ile doğrudan insan ile ilgili bakterilerin dahi tümünün standart besiyerlerinde geliştirilerek izole edilmesi ve tanımlanması henüz tamamlanamamıştır.

Standart gıda mikrobiyolojisi analizlerinde toplam mezofil aerop, koliform grup bakteriler vb. her türlü analizde elde edilen sayım sonucunun gıdada mevcut olan mikroorganizmaların en iyimser tahminle sadece %10 kadarını gösterdiği kabul edilmektedir. Benzer durum, çevre ve klinik numuneler için de geçerlidir.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde, analiz edilen numunede gerçekten hangi gruplarda hangi sayıda mikroorganizma olduğunun tam olarak belirlenmesi önemli değildir. Önemli olan sadece mevcut standartlara göre yapılan analizlerden elde edilen sonuçlardır. Bugün kullanılan besiyerleri ve mikrobiyolojik yöntemler, yeryüzündeki tüm mikroorganizmaları izole etmeye ve tanımlamaya yeterli değildir.

Farklı mikrobiyolojik disiplinlerde yapılan çalışmalarda amaç ve materyal farklılıklarına bağlı olarak çok farklı uygulamalar görülür. Dolayısıyla üzerinde çalışılan mikroorganizmalar da doğal olarak farklı olmaktadır. Bazen aynı mikroorganizmaya farklı disiplinlerde farklı şekilde yaklaşılır. Örneğin, *Clostridium perfringens* gıda mikrobiyolojisinde sıradan bir patojen olarak değerlendirilirken aynı bakteri klinik mikrobiyolojide *Cl. welchii* adı ile bilinir ve gazlı kangren etmeni olduğu için çok önemli bir patojen olarak tanımlanır. *E. coli*, fekal bulaşma göstergesi olduğu için gıdalarda bulunması istenmez ama genetik çalışmalarda önemli bir vektördür.

Gıdalarda başta hammadde kaynaklı olmak üzere farklı türlerde mikroorganizmalar bulunur. Hammadde dışında yardımcı maddeler, ambalaj materyali, işletmede kullanılan su, işletme havası, makine ve ekipman ile çalışanlar da gıdalara mikroorganizma bulaşmasına neden olurlar. Başta sinekler ve kemirgenler olmak üzere pek çok hayvan türü de çapraz kontaminasyonlarda (bulaşmalarda) önemlidir.

Gıda kaynaklı hastalıklar ve gıdalardaki mikrobiyel bozulmalar, hammaddeden tüketime kadar olan gıda üretim zincirindeki bir ya da birden fazla aşamada gıda kaynaklı patojenlerin, saprofitlerin veya mikrobiyel toksinlerin kontrolündeki başarısızlık veya beceri eksikliğinden kaynaklanmaktadır.

Uzun ömürlü süt, sebze konserveleri, et konserveleri gibi gıdalar sterildir ve ambalajları açılmamak kaydı ile mikrobiyolojik olarak bozulmazlar[1]. Pastörize süt ve sucuk gibi gıdalarda ise bozulmaya neden olan mikroorganizmalar vardır ve ambalajı açılmasa dahi zamanla bozulurlar.

Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar 4 ana grup altında toplanabilir:

-Yararlı mikroorganizmalar,

-Etkisiz mikroorganizmalar,

-Saprofitler (çürükçül mikroorganizmalar),

-Patojenler.

İndikatör mikroorganizmalar olarak tanımlananlar bu 4 ana grubun dışında ayrı bir grup değildir. Bunlar saprofit olabileceği gibi bazı patojenler de indikatör olarak kullanılır.

Gıda mikrobiyolojisi, esas olarak gıdalarda bulunan zararlı mikroorganizmalar ile ilgilenir. Buna göre çürükçüller ve patojenler gıda mikrobiyolojisi konularının temelini oluşturur.

Yararlı Mikroorganizmalar

Gıdalarda bulunan yararlı mikroorganizmalar, sağlık için yararlı olanlar ile gıdanın elde edilmesinde kullanılanlar olarak 2 grupta incelenebilir.

Sağlık için yararlı olan mikroorganizmalara en tipik örnek probiyotiklerdir. Sadece insanlar için değil, örneğin çiftlik balıkları dâhil olmak üzere tüm hayvansal üretimde de probiyotik mikroorganizmalar vücut direncinin artırılması ve patojenlere karşı savaş için kullanılmaktadır. Çok büyük çoğunluğu laktik asit bakterileri olan probiyotik türler, bağırsak çeperine tutunarak patojen bakterileri baskılarlar ve sindirim üzerine olumlu etkide bulunurlar.

İnsan gıdası olarak tüketilen pek çok gıdaya probiyotik ilavesi üzerinde çalışılmış olmakla birlikte, bunların içinde en başarılı olan yoğurttur. Standart yoğurt kültürü probiyotik değildir. Bu ifade, yoğurdun yararlı olmadığı anlamına gelmez. Tersine olarak, Rus asıllı bilim adamı Elie Metchnikoff, Bulgarların sağlıklı ve uzun ömürlü olmalarının[2] nedenini yoğurt tüketimi ile ilişkilendirmiş ve bağışıklık konusundaki çalışmaları sonucunda 1908 yılında Nobel tıp ödülü almıştır. Benzer şekilde standart kefir de probiyotik değildir ama yararlı bir gıdadır. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak nitelendirilmesi için bağırsak çeperine tutunabilme yeteneğinin de olması gerekir. Standart yoğurt ve kefir

[1] Bu gibi gıdalarda raf ömrünü belirleyen faktör, mikrobiyolojik değil kimyasal değişmelerdir.

[2] 1800'lü yılların sonundaki nüfus kayıtlarına göre Bulgarların diğer toplumlara kıyasla daha uzun yaşadığı sanılırdı. Ancak o yıllarda nüfus kayıtlarının yetersiz olması ve ayrıca dede, baba ve oğula aynı isimlerin verilmesinin bu yanlış kanıya yol açtığı, gerçekte bunun öyle olmadığı daha sonra anlaşıldı.

kültüründe bu özellik yoktur, ancak bu ürünlerdeki mikroorganizmalar bağırsaktan geçerken sağlık üzerine olumlu katkıda bulunurlar.

Yeteri kadar yüksek sayıda probiyotik mikroorganizmanın bağırsak çeperine tutulması için belli bir süre tüketilmeleri gerekir. Bu amaçla başta yoğurt olmak üzere çeşitli gıdalar taşıyıcı olarak kullanılır. Hayvan beslemede probiyotik mikroorganizmalar doğrudan yeme katılmaktadır. Probiyotiklerin bağırsakta çözünen kapsül içinde vücuda alınması da mümkündür.

Yoğurt, kefir, kımız, boza, tarhana, şarap, sirke ve ekşi hamur gibi onlarca farklı gıda maddesi mikroorganizmalar ile üretilir. Mikroorganizma faaliyeti olmadan bu gıdalar elde edilemez. Çok genel bir tanım ile bunlara fermente gıdalar denilir. Yeryüzünde farklı coğrafyalarda yüzlerce farklı fermente gıda vardır.

Bazı gıdaların üretiminde mikroorganizmalar ürünün duyusal niteliklerine katkı olarak kullanılırlar. Bunun en tipik örneği, *Penicillium roquefortii* kullanılarak elde edilen küflü peynirdir (rokfor peyniri). Bu küf kullanılmadan da peynir elde edilebilir, ancak peynir yapılacak süte eklenmesi sonucunda farklı duyusal karakterde peynir elde edilir.

Yarar ve zarar kavramı görecelidir. Rokfor peyniri üretiminde kullanılırken yararlı olan *Penicillium roquefortii* küfü, Beyaz peynir, Kaşar peyniri ya da dünyada en fazla üretilen Cheddar peynirine bulaşırsa bu peynirlerde kalite açısından izin verilen küf sayısını geçer ve kalite kaybı nedeni ile bu ürün "tüketilemez" olarak değerlendirilir. Bir başka örnek, amaç sirke elde etmek ise sirke bakterisi yararlıdır, ancak aynı bakteri şarap işletmesine bulaşırsa önemli ekonomik kayıplara neden olur.

Bazı basın ve yayın organlarında zaman zaman çiğ sütte insan sağlığı için yararlı bakteriler olduğu ve buna bağlı olarak çiğ süt içilmesi gerektiği şeklinde son derece yanlış ve tehlikeli bildirimlere rastlanmaktadır. Çiğ sütte insan sağlığı için yararlı bakterilerin olduğu doğrudur ancak

-Bunların sayısı, insan sağlığı için yararlı olamayacak kadar azdır,

-Çiğ sütte patojen bakteri bulunma potansiyeli her zaman vardır.

Sonuç olarak, çiğ süt içilmesi akıl ve bilim ile örtüşmez.

Çeşitli fermente gıdaların üretiminde kullanılan yüzlerce farklı tür mikroorganizma vardır. Bunların dışında rennin enzimi gibi gıdaların üretiminde dolaylı olarak kullanılanlar da vardır, ancak "Gıda Mikrobiyolojisi", asıl olarak gıdalarda istenmeyen mikroorganizmalar ile ilgilendiği için bu bölümde bu kadar bilgi yeterli görülmüştür.

Etkisiz Mikroorganizmalar

Gıdalarda normal depolama koşullarında bozulmaya neden olabilecek metabolik aktiviteleri çok düşük olan ve sindirim yolu ile vücuda girdiklerinde hastalıklara neden olmayan çok sayıda mikroorganizma bulunur.

Bunlar sadece gıdanın genel kalitesinin kontrol edildiği toplam aerobik koloni ve toplam maya-küf analizlerinde koloni oluşturarak gıdanın genel kalitesinin düşük olarak değerlendirilmesine neden olurlar.

09.02. Saprofitler (Çürükçüller) ve Gıdaların Bozulması

Gıda mikrobiyolojisi açısından bakıldığında çok genel tanımı ile gıda kaynaklı hastalıklara neden olmayan, ancak gıdaların bozulmasına neden olan mikroorganizmalardır. Çürükçüller, gıdalarda gelişip belirli bir sayıya eriştiklerinde gıdanın duyusal karakteristiklerinde ekşime, pıhtılaşma, kokuşma, şişme, erime, renk ve görüntüde değişme vb. gibi istenmeyen değişmelere yol açarlar. Çok genel olarak kabul edildiği şekliyle, gıdada mikroorganizma sayısı 10^6 KOB/ g(mL) düzeyine çıktığında duyusal niteliklerde değişme başlar. Bu sayı ne kadar artarsa bozulma o denli ilerlemiş olur.

Bu grup mikroorganizmalar, yüksek sayılarda vücuda girdiklerinde hastalıklara neden olabilirler. *Bacillus cereus*, önceden saprofit olarak tanımlanırken sonradan patojen olduğu saptanmıştır. *Bacillus subtilis*, en tipik saprofit bakterilerden birisi iken bazı biyotiplerinin toksin oluşturabildiği belirlenmiştir.

Patojenler de gıdalarda yüksek sayılarda geliştiklerinde gıdalarda bozulmalara neden olurlar. Bu şekilde ister saprofitler ister patojenler tarafından bozulmuş olan bir gıdanın tüketici tarafından tüketilmesi beklenmez.

Gıda mikrobiyolojisi, saprofitlerin gıdalarda bozulmaya neden olma potansiyeli ile ilgilenir ve buna göre toplam *Enterobacteriaceae*, toplam koliform grup bakteri, toplam aerobik mezofil bakteri, toplam maya ve küf gibi kalite ve hijyen indikatörlerinin gıdalarda belirli sayılarda bulunmalarını denetler. Patojenler halk sağlığı açısından önemli iken saprofitler çok genel olarak ekonomik kayıplar açısından önemlidir.

Çürükçül mikroorganizmalar, gıdaların bozulmasına neden oldukları için gıda mikrobiyolojisi açısından istenmeyen gruptadır. Ancak bu grup, ölmüş bitki ve hayvan dokularını parçalayarak (bir anlamda ve basit bir ifade ile fotosentezin tersini yaparak) atmosfere CO_2 verirler ve doğada karbon döngüsüne katılırlar. Bu açıdan bakıldığında saprofitler, dünyanın genel yaşam döngüsü içinde ve en azından bitkiler kadar yararlı canlı türleri olarak da kabul edilir.

Bütün maya ve mikotoksijenik olmayan küf türleri ile listelenemeyecek kadar çok sayıda bakteri türü, gıdalar üzerinde geliştiklerinde bozulmalara yol açarlar. Gıdanın asitliği, su aktivitesi, O/R potansiyeli ve muhafaza koşulları, farklı saprofit türlerin gelişmesinde etkilidir.

09.03. Patojenler ve Gıda Kaynaklı Mikrobiyel Hastalıklar

Gıdalara çeşitli yollarla patojen mikroorganizmalar, ağır metaller ve diğer kimyasallar bulaşabilir ya da bazı şapkalı mantarlarda olduğu gibi gıdanın kendisi doğal olarak toksin bulundurabilir.

Patojen olarak adlandırılan mikroorganizmalar insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde hastalık oluşturanlardır. Bunlardan insanlarda gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklara neden olanların sayısı, yeryüzünde bulunan mikroorganizma türü sayısı ile kıyaslandığında son derece önemsizdir. Mikotoksijenik küf sayısı çok yaklaşık 350 iken gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren (sindirim yolu ile vücuda giren) patojenik bakteri sayısı, fırsatçı (oportünist) patojenler de dâhil olmak üzere 15-20 kadardır. Bunların arasında ise sadece 4 bakteri önem taşır: *Campylobacter jejuni*, patojenik *Salmonella* serotipleri, *Listeria monocytogenes* ve VTEC (Verotoksijenik *E. coli*) serotipleri. Bu 4 grup bakteri, gıda kaynaklı olarak en fazla sayıda hastalanmaya ve ölüme neden olanlardır. VTEC içinde daha önce sadece *E. coli* O157:H7 serotipi önemli iken 2011 Mayıs ayında Almanya'da salgına neden olan *E. coli* O104:H4 serotipi nedeni ile patojenik *E. coli* serotipleri daha geniş bir grup ile tanımlanmaktadırlar.

Mycobacterium tuberculosis, *Salmonella* Typhi, *Vibrio cholerae* gibi primer patojenler, gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalık etmenleri arasında yer almaz. Bunlarda gıda sadece taşıyıcı konumdadır. Bunların hammadde, gıda işlemleri, nakliye, depolama, dağıtım vb. süreçlerde gıda ile bir ilgileri yoktur. Dolayısı ile bu gibi bakteriler, gıda mikrobiyolojisi ilgi alanına girmez. *Brucella,* hammadde ile ilişkilendirilerek bazı gıda mikrobiyolojisi disiplinlerinde yer alır.

Yetersiz teknolojik uygulamalar, yetersiz soğutma, yetersiz pişirme ve yeniden ısıtma, hasta personel çalışması, taşıyıcı (portör) personel çalışması, yetersiz personel hijyeni ve çapraz bulaşmalar, özellikle toplu tüketim yerlerinde gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasında başlıca nedenlerdir.

09.03.01. Patojen ve Saprofit Ayrımı

Mayalar içinde sindirim sistemi ile alındığında hastalık yapan türler yoktur ya da daha doğru bir ifade ile bugüne kadar böyle bir maya türüne rastlanmamıştır[3]. Küfler ise mikotoksin aracılığı ile başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklar yaparlar. Dolayısı ile gıda kaynaklı hastalıklar açısından patojen deyimi daha çok bakteriler için kullanılır. Mikotoksin oluşturan küfler ise mikotoksijenik olarak tanımlanır. Klinik ve veteriner mikrobiyolojide patojenik küf deyimi yaygın bir şekilde kullanılır. Gıda mikrobiyolojisi açısından, mikotoksijenik küflere patojen denilmesi hatalı değildir.

[3] Sindirim sistemi ile alınmadan kasıt, doğrudan gıda tüketimidir. Maya türleri arasında özellikle kadın hastalıklarına yol açanlar vardır.

Bir bakterinin patojen olarak değerlendirilesi için minimal enfeksiyon dozunun düşük olması gerekir. Bu değer *E. coli* O157:H7 serotipi için 1 adet olarak verilmektedir. Bunun anlamı, bu bakterinin sağlıklı ve ergin insanlarda hastalık yapması için vücuda sindirim yolu ile 1 adet girmesinin yeterli olmasıdır. Bu durumda, minimal enfeksiyon dozu ne kadar düşük ise bakterinin patojenitesi o denli yüksektir. Minimal enfeksiyon dozu, salgın sonrasında arta kalan gıdalardaki patojenlerin sayılması ile belirlenir. Düşük dozda patojenite gösteren türler için özellikle ABD'de gönüllüler ile de çalışılmaktadır. *B. cereus*'un patojen olduğunu iddia eden Dr. Huge, bu denemeyi kendi üzerinde yapmıştır (bknz ⇒ 09.19. bölüm).

Gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklarda gıdanın fiziksel ve duyusal nitelikleri önemlidir. Çok genel olarak bir gıda 10^6-10^7 KOB/g-mL sayıda mikroorganizma içeriyorsa fiziksel ve duyusal açıdan fark edilebilecek şekilde bozulmaya başlamıştır. Bir diğer deyiş ile gıda erime, kokuşma, renk değişikliği, ekşime, şişme vb. fiziksel ve duyusal özellikleri ile orijinalliğini yitirmiştir. Tüketici, bu değişikliği fark eder ve gıdayı tüketmez. Ancak gıdanın bir porsiyonunda sadece 1 adet *E. coli* O157:H7 serotipi varsa, tüketicinin bunu fark etmesi beklenemez. Hatta 10^4 - 10^5 KOB/g-mL sayıdaki patojen varlığı da tüketici tarafından kolaylıkla fark edilemez[4].

Patojen olarak tanımlanan bir bakteri, gıda üzerinde çok fazla gelişirse yine gıdanın fiziksel ve duyusal özelliklerini değiştirir. Sadece patojenler değil özellikle saprofitler ve indikatörler de gıda üzerinde geliştiklerinde çeşitli duyusal değişikliklere yol açarlar. Burada gıdanın orijinal fiziksel ve duyusal özelliklerinde değişme olup olmamasının önemi bir kez daha vurgulanmaktadır. Saprofit karakterli olduğu kabul edilen bir bakteri (örneğin bazı *Bacillus subtilis* biyotipleri), insanlarda hastalık yapacak sayıya eriştiğinde gıda çok muhtemelen fiziksel ve duyusal orijinalliğini yitirmiş olacaktır.

Fırsatçı (oportünist) patojenler olarak tanımlananlar ise sağlıklı ergin insanlarda hastalık oluşturamazlar. Ancak başka bir hastalığa bağlı olarak vücut direncinde bir azalma olursa fırsat bulup hastalık oluştururlar.

09.03.02. Enfeksiyon ve İntoksikasyon

Gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar temel olarak iki ana gruba ayrılır: Enfeksiyon ve intoksikasyon. Enfeksiyon etmeni mikroorganizmalar canlı olarak insan vücuduna girerler, bir şekilde bağırsağa kadar gidip orada çoğalırlar ve toksinlerini bağırsakta salgılayarak hastalığa neden olurlar. Bunlar, dışkı ile çevreye yayılıp salgın hastalıklara yol açarlar. Yukarıda değinilen 4 önemli patojen bakteri (*Camp. jejuni*, patojenik *Salmonella* spp., *List. monocytogenes* ve VTEC serotipleri) enfeksiyon tip hastalık etmenidirler.

[4] FDA, şüphe edilen gıdanın tüketilmemesini önermektedir.

Enfeksiyon tipte hastalık yapanlardan patojenik *Salmonella* spp, *List. monocytogenes* ve *Camp. jejuni* tipik enfeksiyon etmeni olarak tanımlanırken kimi kaynaklar *Clostridium perfringens* ve *E. coli* O157:H7 serotipini toksikoenfeksiyon etmeni olarak anarlar. Enfeksiyonda bakteri doğrudan bağırsak çeperine tutunarak iltihap yaparken toksikoenfeksiyonda patojen canlı olarak erişebildiği ince bağırsakta çoğalır, hastalığa neden olan toksini bağırsakta salgılar ve hastalığa bu toksin neden olur. Güncel kullanımda enfeksiyon ve toksikoenfeksiyon ayrımının önemi yoktur, tümü enfeksiyon olarak tanımlanır. Enfeksiyon tip hastalıkların en büyük özelliği salgına neden olmalarıdır. Bu nedenle daha fazla hastalık ve dolayısı ile ölüme neden olurlar. Bugüne kadar görülmüş büyük salgınlarda anaokulları ve yaşlı bakım evleri çıkışlı salgınlar dikkat çekmektedir. Kişisel hijyene yeterince dikkat edilemeyen bu gibi yerlerde kişiden kişiye bulaşma olmakta ve ebeveynler de dolaylı olarak hastalanmaktadır. Kişiden kişiye bulaşmalar ve salgınlarda, dışkı en önemli rolü oynamaktadır.

İntoksikasyonda ise mikroorganizma gıda üzerinde gelişerek toksin salgılar. Hastalığa neden olan bu toksindir. Toksini salgılayan mikroorganizmanın gıda üzerinde canlı kalmış olması ya da toksini salgıladıktan sonra basitçe bir pastörizasyon sonrası ölmüş olmasının bir önemi yoktur. Toksin, sadece bu gıdayı tüketen kişiyi etkiler ve salgın hastalık söz konusu değildir. *Clostridium botulinum* ve *Staphylococcus aureus* ile mikotoksinler, intoksikasyon tip hastalık etmenleridir. Bir yaklaşıma göre şapkalı mantar zehirlenmeleri de bu gruba girer.

Mikroorganizmalar ya enfeksiyon tip ya da intoksikasyon tip zehirlenme yapar diye bir kural yoktur. Örneğin *Bacillus cereus*, her iki tip hastalığa da yol açabilir.

09.03.03. Mide Asitliği Faktörü

Sağlıklı bir insanın mide asitliği ~1,5-2,0 pH'dır. Hangi patojen olursa olsun bu asitlikte 20-30 dk içinde tümüyle yok olur. pH, midenin her yerinde aynı değildir.

Sindirimin 3-4 saat sürdüğü bilinse de 3-4 saat sürekli olarak midede tutulan gıdanın bu süre sonunda tamamının ve bir defada mide dışına çıkartılması söz konusu değildir. Tersine olarak, belirli aralıklarla (5-10 dk) bir miktar mide içeriği (~2,5-3,0 mL) sindirim sisteminin ileriki aşamalarına verilir.

Enfeksiyon tip hastalık etmeni patojen bakteri, midede uzun süre kalmadan asitlikten kurtularak bağırsağa giderse orada sayısını artırarak hastalığa neden olur. Toplu zehirlenme olarak tanımlanan hastalanmalarda neden bazı bireylerin hastalandığı ama diğerlerinin hastalanmadığı sorusunun yanıtlarından birisi de budur. Diğer önemli yanıt ise bireysel direnç farkıdır.

Diğer bir faktör, patojen içeren gıda ile birlikte yenilen diğer gıdalardır. Hastalık etmeninin salata olduğunu varsayalım. Yanında bol miktarda et yenildiğinde mide asitliği önemli ölçüde düşer ve patojen bakterinin yaşama şansı yükselir.

Mayonez gibi yağlı gıdalarda yağ, çoğu defa patojeni bir yangın battaniyesi gibi sararak asitliğin olumsuz etkisinden kısmen de olsa koruyabilir.

09.03.04. Hastalığa Yol Açan Patojen Sayısı

Yukarıda da belirtildiği gibi *E. coli* O157:H7 serotipi için minimal enfeksiyon dozu sadece 1 adettir. Bir gıdanın her porsiyonunda eşit olarak dağılmış 1 adet *E. coli* O157:H7 serotipi olduğunu ve bu gıdayı askeri birlik/ sporcu kafilesi örneğinde olduğu gibi ergin ve sağlıklı bir grubun tükettiğini varsayalım. Yine yukarıda örneği verildiği şekli ile sindirim sisteminin özelliğine bağlı olarak bakteri kimi bireylerde mide asitliğinden kaçabilecek iken kimilerinde kaçamayacaktır.

Buna bağlı olarak minimal enfeksiyon dozu çok düşük olsa bile patojen bakteri sayısı 1-2 adet gibi çok az sayıda ise bireyler arasında hastalanma oranı farklı olacaktır. Bu örnekte olduğu gibi patojen bakteri sayısının 1 adet/ porsiyon yerine 10 adet/ porsiyon olması, doğal olarak aynı gıdayı tüketen bireylerde hastalanma oranını da yükseltecektir.

Minimal enfeksiyon dozu, hastalanmış bireylerin tükettiği arta kalan gıdada saptanabilen en düşük patojen sayısıdır ve makul ölçüde tüketilen gıda porsiyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bazı bireylerin tükettiği porsiyon miktarının standartların üzerinde olduğu da açıktır. *E. coli* O157:H7 serotipi gibi öldürücü ya da kalıcı sağlık sorunu yaratacak olanlar için değil, ancak sadece ishal, karın ağrısı, mide krampları ya da kusma gibi daha yumuşak seyreden hastalıklarda minimal enfeksiyon dozunun belirlenmesi, gönüllüler ile de yapılır ve bu uygulama asıl olarak ABD'ye özgüdür. Botulinin öldürücü dozunun belirlenmesi ise 2. Dünya Savaşı'nda esirler üzerinde denenerek yapılmıştır.

09.03.05. Risk Grupları

Çocuklar, yaşlılar, gebeler ve hastalar (özelikle bağışıklık hastaları), gıda kaynaklı mikrobiyel hastalıklardan daha fazla etkilenirler ve bu 4 grup "risk grubu" olarak tanımlanır. Yeryüzünde önemli gıda kaynaklı salgınların çıkış ya da yayılış yerlerinin anaokulları, kreşler ve yaşlı bakım evleri olduğu açıktır. FDA, hamile olduğunun henüz farkında olmayan kadınları en yüksek riskli olarak göstermektedir.

09.03.06. Gıda Kaynaklı Mikrobiyel Hastalık İstatistikleri

Gıda kaynaklı mikrobiyel hastalıklarda istatistiklerin en iyi tutulduğu ülke ABD'dir. Bunun nedeni tümüyle ekonomidir. Hastalandığı için işe gidemeyen birey, sigortadan parasını alabilmesi için hastalandığını kanıtlamak zorundadır.

ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) 2016 yılı verilerine göre ABD'de her yıl gıda kaynaklı olmak üzere yaklaşık 48 milyon hastalanma, 128 bin hastaneye yatma ve 3 bin ölüm olduğu tahmin edilmektedir.

Türkiye'de ise 1993-1998 yılları arasında 26.155 gıda kaynaklı hastalık saptanmış ve 175 kişinin öldüğü bildirilmiştir.

Gıda kaynaklı hastalıkların sayısında devamlı bir artış gözlenmektedir. Türkiye'de yapılmış olan bir diğer çalışma raporuna göre 1999-2000 yıllarında toplam 161.855 gıda kaynaklı hastalık vakası kaydedilmiştir. Türkiye'de meydana gelen gıda kaynaklı mikrobiyel hastalıklarda *Salmonella* spp. birinci sıradadır. 1994 yılında 28.884, 2000 yılında ise 24.498 salmonellosis vakası saptanmıştır (kaynak: Gıda Güvenliği ve Mikrobiyolojik Riskler. Aybak Natura Analiz Laboratuvar Hizmetleri San. ve Tic. Ltd Şti.).

Bugün Türkiye'de gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkin kayıtlar son derece zayıftır. Bunun başlıca nedenleri arasında kamu kuruluşlarının yeterince koordinasyon ile çalışamaması, laboratuvarlar arasındaki koordinasyon eksikliği, çoğu toplu zehirlenme vakalarında virüs analizi yapılmaması, nitelikli personel ve laboratuvar sayısında yetersizlik sayılabilir.

Gıda kaynaklı mikrobiyel hastalıkların düzenli olarak kayıtlarının tutulduğu ülkelerde yıllara göre giderek artış olduğu gözlenmektedir. Bu artışın nedeni doğrudan ve dolaylı olarak 2 ana grupta toplanabilir. Asıl neden dolaylı artışlardır.

Doğrudan artışlar basit olarak toplu tüketimin artması, hazır gıdaya daha fazla talep, çarpık kentleşme, uluslararası göç hareketleri ve yoksulluk nedeni ile çöpe atılmış gıdaların tüketilmesi vb. gibi onlarca neden ile açıklanabilir. Asıl etmen olan dolaylı artışlar ise sağlık kayıtlarının daha düzenli tutulması ve hastalık etmenlerinin saptanmasıdır.

Dolaylı artışlarda, her yıl 10 birim hastalık varken bunun ne kadarının kayıtlara geçirildiğidir ve bu oran basit olarak gelişmiş ülkelerde %10, gelişmekte olan ülkelerde %1 olarak kabul edilmektedir. Bireysel sigorta ödemelerindeki zorunluluğa bağlı olarak, giderek daha fazla hastalık kayıtlara geçmektedir.

Türkiye'de 2005 yılında kuş gribi paniği olmuştur. Önceki yıllarda kuş gribinden kaç kişinin öldüğü bilinmemektedir. Hastalık ciddi şekilde zatürre ile karıştırılmaktadır. 2005 yılında ise Türkiye'de hastalığın adı konulmuş ve dünya sağlık istatistiklerine kuş gribi ölüm vakası olarak kayda girmiştir.

Gıda kaynaklı hastalıkların yıllara göre artış nedenleri üzerinde Gıda Güvenliği bölümünde daha detaylı bilgi verilmiştir (bknz ⇒ 12. bölüm).

09.03.07. Gıda Kaynaklı Mikrobiyel Hastalık Etmeninin Saptanması

Robert Koch (1843-1910) tarafından ortaya konulan ve Koch postulatı olarak anılan kavram

-Hastalık etmenini izole et,

-Sağlıklı bireye kontamine et,

-Semptomların aynı olduğunu gözle,

-Hastalık etmenini yeniden izole et ve ilk izolat ile aynı olduğunu kanıtla şeklindedir.

Bu postulat orijinal olarak sığırlarda şarbon için geliştirilmiş, ancak o tarihte çok yaygın olan insan tüberkülozu için etik değerler çerçevesinde uygulanmamıştır.

Bugün ölümle sonuçlansa bile yenilen/ içilen gıdalara bağlı hastalıkların gerçek nedeni bazen kesin olarak saptanamamaktadır.

Özellikle toplu tüketim birimlerinde tüketicilere sunulan gıdaların "semptomların görüldüğü genel olarak kabul edilmiş süre olan" 72 saat süre ile soğutulmuş olarak saklanma zorunluluğu vardır. Bu sürede bireysel ya da toplu bir hastalanma olur ise;

-Hastanın dışkısından/ kusmuğundan/ vb. vücut örneklerinden patojen bakteriyi izole et,

-Şüpheli gıdadan aynı bakteriyi (genotip/ serotip) izole et ve sayısını belirle,

-Bu bakterinin gerçekten patojen olduğunu kanıtla şeklinde bir yol izlenmektedir.

Salmonella gibi enfeksiyon tip hastalık yapan bir bakterinin hastanın dışkısından ve şüpheli gıdadan izole edildiğinde şüpheli gıdadaki sayısı belirlenemezse bu bulgu geçersizdir[5].

Hastanın başka bir gıdadan aynı serotipi almış olması, gerçek hastalanma etmeninin gözden kaçırılmış olmasına neden olabilir.

Benzer durum intoksikasyon etmenleri için de geçerlidir. Basit bir örnek ile hastanın dışkısında ya da kusmuğunda *Staph. aureus* toksini bulunabilir. Devamında şüpheli gıdadan da yüksek sayıda toksin oluşturabilen *Staph. aureus* sayılabilir. Ancak bu bulgular hastanın gerçekten söz konusu gıda aracılığı ile hastalandığını kanıtlamaz. Gıdada yüksek sayıda toksin oluşturabilen *Staph. aureus* varlığı çok da önemli değildir. Gıdanın asitliği, depolama sıcaklığı, su aktivitesi vb. koşullar *Staph. aureus* tarafından toksin salgılamasını ciddi şekilde etkiler.

Toplu zehirlenme vakalarında ise gerçekten hastalanan kişiler yanında psikolojik olarak aynı (ishal, kusma, mide krampı, ateş vb.) semptomları gösteren bireylere ek olarak işten/ okuldan kaytarmak için ilgili kurum doktoruna gerçekten hastalanan kişilerin semptomlarını bildiren bireyler olduğu da bilinmektedir. Ancak ilgili kurum doktoru, tüm bu kişilerin benzer semptom gösterdiğini kayda alır ve sonuçta kayıtlara abartılı şekilde zayıf bir patojenin toplu zehirlenmeye neden olduğu geçebilir.

Bu gibi yanıltıcı örnekler, dünya "gıda kaynaklı mikrobiyel hastalıklar" tarihinde mevcuttur ve bazı toplu zehirlenme vakaları "faili meçhul" olarak kalmaktadır.

[5] Yasal kuralların sürekli değiştiğine bir kez daha dikkat çekilmektedir.

09.04. İndikatör Mikroorganizmalar

Gıda mikrobiyolojisinde kullanılan indikatör mikroorganizmalar, gıdanın kalitesi ve güvenliği hakkında hızlı bir şekilde bilgi verirler. Bunlar, gıda üretiminin mikrobiyolojik açıdan yeterliliğinin, hammadde ve işlenmiş gıdaların kalite ve güvenliğini içeren kontrol sistemlerinin ve mikrobiyel kontrol önlemlerinin etkinliğinin denetlenmesinde kullanılmaktadır.

Gıdalardaki patojenlerin analizinde kullanılan ve uluslararası geçerliliği olan yöntemler, bir ya da iki aşamalı zenginleştirme, selektif katı besiyerine ekim, tipik kolonilerin izolasyonu ve tanımlanması aşamalarını içerir. Bunlar hassas yöntemler olmalarına karşı çok sayıda besiyeri çeşidi kullanılması nedeni ile analiz maliyetleri bazen gıda işletmesi için yüksek olabilmektedir.

Analiz maliyetleri önemli olabilmekle birlikte asıl sorun analiz süresidir ve birincil (primer) patojenlerin analizinde selektif katı besiyerinde tipik koloni görülmemesi [yok/25 g(mL) sonucu)], *E. coli* O157:H7 serotipi için 2 gün, *Salmonella* için 3 gün ve *Listeria monocytogenes* için 4 gün süreye gerek vardır. Petri kutusunda tipik koloni görülürse analiz daha da uzamaktadır.

Gıdalarda indikatör mikroorganizmaların analizi prosesteki hatalar, proses sonrası kontaminasyon, genel hijyen düzeyi ve gıda kaynaklı patojenlerin olası varlığı veya yokluğu hakkında basit, güvenilir ve hızlı bilgi sağlar. Bu analizler özel olarak patojenlerin analizi yerine geçemez, ancak patojenin izolasyonu ve tanımlanması için gereken zamandan çok daha kısa sürede bilgi verir. Bu nedenle indikatör analizleri, sanitasyon koşullarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu analizler, Doğru Üretim Uygulamaları (GMP), Doğru Hijyen Uygulamaları (GHP), Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları (HACCP) vb. kalite sağlama uygulamalarında "izleme" amacıyla da kullanılır. Gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde indikatörlerin kullanımı, ulusal ve uluslararası standartlarda yer alan kriterlere yüksek oranda bağlıdır.

İndikatör mikroorganizmalar, gıda kalitesine ve gıda güvenliğine yönelik olarak iki gruba ayrılır.

09.04.01. Gıda Kalitesine Yönelik İndikatör Mikroorganizmalar

Gıda kalitesine yönelik indikatörler genellikle ürüne özgüdür. Mevcut kaliteyi değerlendirmede ve raf ömrünü tahmin etmede kullanılabilir. Örneğin koliform grup bakteriler, indikatör mikroorganizma olarak en çok kullanılanlardan birisidir. Özellikle işlenmiş gıdalarda hijyenik koşullara ve toplam kaliteye işaret eder. Normal düzeylerdeki koliform bakteriler pastörizasyon, ozon uygulaması ve ışınlama gibi prosesler ile inaktive olur. Koliform bakterilerin gıdalarda bulunması prosesin yetersizliğini veya proses sonrası bulaşmayı gösterir.

Bu amaçla kullanıldığında ideal indikatör mikroorganizmaların aşağıdaki özelliklere sahip olması gerekir:

-Bütün gıdalarda bulunmalı ve tespit edilebilmelidir,

-Kolay tespit edilebilmeli, sayılabilmeli ve diğer mikroorganizmalardan kolayca ayırt edilebilmelidir,

-Analizi en fazla 24 saat gibi kısa bir sürede gerçekleşmelidir,

-Hücresel hasara dirençli olmalı, analiz sırasında sayısı azalmamalı, depolama sırasında buzdolabı sıcaklığından ve homojenizasyon sırasında blender hızından etkilenmemelidir,

-Patojenik olmamalı veya analizi yapan personele zarar vermemelidir,

-Gıdadaki varlığı ya da sayısı, ürün kalitesi ile doğrudan negatif ilişkiye sahip olmalıdır,

-Gıdanın florasındaki diğer mikroorganizmalar indikatörün gelişimini etkilememelidir.

Toplam *Enterobacteriaceae* aranması ya da sayılması, koliform grup bakterilere kıyasla daha yüksek bir kalite standardı gösterir, çünkü koliform grup bakterilerin de içinde olduğu daha fazla sayıda cins ve tür, indikatör mikroorganizma olarak analiz edilmektedir. Analiz edilen numunede *Enterobacteriaceae* yoksa zaten koliform grup bakteriler, fekal koliformlar, *E. coli* ve enterik patojenler de yoktur.

Gıdalarda yapılan toplam aerobik mezofil bakteri ve toplam maya-küf analizi de gıdanın mikrobiyolojik kalitesini göstermekle birlikte analiz süresi açısından bunlar, indikatör mikroorganizma olarak genellikle kabul edilmezler.

09.04.02. Gıda Güvenliği ile İlişkili İndikatör Mikroorganizmalar

Bu indikatörler genellikle benzer çevreden gelen patojenler ile ilişkilidir. Örneğin bağırsak patojenleri, bağırsak dışında çevrede ve gıdalarda da canlı kalabilirler. Bu indikatörler kalite değil asıl olarak gıda güvenliği ve sanitasyon indikatörü olarak kullanılmaktadır.

Gıda güvenliği ile ilgili indikatör denildiğinde ilk akla gelen bakteri *E. coli* biyotip 1'dir. Doğada sadece sıcakkanlı hayvanların (memeli hayvanlar ve kanatlılar[6]) bağırsaklarında bulunur. Bir gıda ya da çevre veya klinik numunede bu bakteriye rastlanması o numuneye sıcakkanlı hayvanların dışkısının bulaştığının kanıtıdır. Dolayısıyla doğrudan fekal kontaminasyon indikatörüdür. Buna göre yine sıcakkanlı hayvanların dışkılarında bulunan *Salmonella*, *Shigella*, VTEC serotipleri de aynı numunede bulunabilir. Bir anlamda *E. coli* biyotip 1 varlığı, aynı numunede enterik patojenlerin varlığı açısından potansiyel bir risk olduğunu gösterir.

[6] Kanatlılar ile kasıt, asıl olarak kümes hayvanları ve kuşlardır. Sinek, kelebek, arı vb. gibi kanadı olan böcekler bu grupta anılmazlar. Bazı literaürde kanatlılar yerine kuşlar deyimi kullanılır.

E. coli biyotip 1, patojen değildir. Nadiren idrar yolları enfeksiyonlarına yol açar. Tersine olarak, vücutta vitamin biyosentezine katıldığı için yararlı olarak dahi kabul edilmektedir.

Her ne kadar sıcakkanlı hayvanların dışkısı ile bulaşmadığı kesin olan çevre numunelerinde *E. coli* biyotip 1'e rastlanmış olması, bu bakterinin rüzgâr ile taşınmış olabileceği olasılığını gündeme getirmişse de bu konu üzerinde fazlaca durulmamıştır, çünkü *E. coli* biyotip 1, rüzgâr ile taşınabiliyorsa doğaya salındığı aynı dışkıda potansiyel olarak bulunabilecek *Salmonella*, *Shigella* ve VTEC serotipleri de aynı şekilde taşınabilir.

İdeal gıda güvenliği indikatörleri aşağıdaki özellikleri taşımalıdır:

-Kolay ve hızlı tespit edilebilmelidir,

-Gıdada bulunan diğer mikroorganizmalardan kolaylıkla ayırt edilebilmelidir,

-Hedef patojen varlığında her zaman bulunmalıdır,

-Hedef patojen sayısı ile indikatör sayısı arasında korelasyon olmalıdır,

-Gelişme istekleri ve gelişme oranları hedef patojenlerinkine eşit olmalıdır.

-Hedef patojenin olmadığı gıdalarda düşük sayılarda olmalı veya bulunmamalıdır,

-Uygun şekilde analizi yapıldığında analizi yapan kişiye zarar vermemeli ve patojenik olmamalıdır.

Fekal kontaminasyon indikatörü olarak *E. coli* biyotip 1 yerine fekal koliform grup bakterilerin kullanılması daha yüksek gıda güvenliği sağlar. Çünkü fekal koliformlar, içlerinde *E. coli* biyotip 1'in de olduğu daha çok sayıda cins ve tür içerirler. Bazı gıdalarda *E. coli* biyotip 1 bulunmadığı halde diğer fekal koliformlar bulunabilmektedir. Ancak fekal koliform analizi ile *E. coli* biyotip 1 analizi kıyaslandığında fekal koliform aranması/ sayılmasında sahte pozitif ya da sahte negatif sonuç alınma şansı daha yüksektir.

İçme ve kullanma sularında fekal kontaminasyon indikatörü olarak enterokoklar da kullanılır ve özellikle su mikrobiyolojisini ilgilendiren standartlarda enterokokların aranması/ sayılması vardır. Enterokoklar da dışkı kökenlidir ve dolayısıyla fekal kontaminasyon indikatörü olarak kullanılırlar. Önceden bu grubun analizinde sorunlar yaşanmışsa da kromojenik besiyerlerinin geliştirilmesi ile bu sorunlar ciddi şekilde giderilmiştir. Enterokoklar, *E. coli* biyotip 1'e kıyasla olumsuz çevre koşullarına ve klor uygulamalarına daha yüksek direnç gösterirler ve dolayısıyla fekal kontaminasyonu daha yüksek düzeyde kanıtlarlar. Ancak olumsuz çevre koşulları ve klor uygulamaları sonunda *E. coli* biyotip 1, yok olmuşsa enterik patojenler de ölmüştür. Buna karşın risk açısından sadece *E. coli* biyotip 1 yeterli görülmemektedir.

Cl. perfringens de dışkı kaynaklıdır ve özellikle içme ve kullanma sularında fekal kontaminasyon indikatörü olarak kullanılır. Analizi, *E. coli* biyotip 1 ve enterokoklara kıyasla daha zor ve karmaşıktır.

09.05. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri

Gıda mikrobiyolojisinde, yaygın olarak kullanılan şekliyle toplam bakteri kavramı, sadece bir simgedir ve aksi belirtilmedikçe plate count agar (PCA) besiyerinde ve 28-30 ^{o}C'ta[7] 72 saat aerobik inkübasyon sonunda oluşan tüm kolonilerin sayısını ifade eder. Analiz edilen numunede aerobik ve mezofil karakterli olsa bile bütün bakteriler, bu besiyerinde koloni oluşturamaz. Örneğin yoğurt bakterileri, PCA besiyerinde gelişmedikleri için koloni oluşturamazlar, ancak MRS agar ve M17 agar gibi daha zengin besiyerlerinde koloni oluşturabilirler. Buna göre bir yoğurt numunesinin analizinde toplam mezofil aerop bakteri sayısı <10 KOB/g ama toplam laktobasil sayısı 10^{8} KOB/g olabilir. Benzer şekilde halofil bakteriler de PCA besiyerinde gelişip koloni oluşturamazlar. Tersine olarak, nötr pH'lı PCA besiyerinde bazı maya türleri de bu inkübasyon koşullarında gelişerek koloni oluşturabilirlerken küfler, çok genel olarak 72 saat içinde koloni oluşturamazlar. Bu analizde oluşan kolonilerin tamamına yakını bakteri kolonisidir. Kolonilerin bakteri ya da maya kolonisi olması önemli değildir, tüm koloniler sayılarak sonuç "toplam aerobik mezofilik koloni" sayısı olarak verilir.

Farklı standartlarda bu kavram; toplam aerobik koloni sayısı, toplam canlı sayısı (Total Viable Count; TVC) ya da Total Viable Organisms (TVO), Total Plate Count (TPC), toplam (total) jerm, Aerobic Plate Count (APC) vb. isimlerle de anılır.

Toplam aerobik koloni sayısı, AB ülkeleri açısından genel kalite kriteri olarak kabul edilir. Farklı gıda gruplarında izin verilen farklı sayılarda toplam aerobik koloni sayısı olabilir. ABD'de FDA kurallarına göre toplam aerobik koloni sayımı 35±1 ^{o}C'ta 48 saat inkübasyon ile belirlenir ve gıdanın hijyenik durumu hakkında fikir edinilir.

Herhangi bir gıda, çevre ya da klinik numunedeki canlı bütün bakterileri sayacak kültürel bir yöntem olmadığı gibi gıda sanayisi açısından böyle bir gereklilik yoktur. Klinik mikrobiyolojideki bazı araştırmalarda ölü mikroorganizma hücreleri de hücre içeriği açısından incelemeye değer bulunsa da gıda mikrobiyolojisi, tümüyle canlı hücrelerle ilgilenir.

Çiğ sütlerde Breed yöntemiyle (bknz⇒ 08.05.01. bölüm) yapılan sayımda canlı ve ölü bakteriler ayırt edilemez ama sütün hammadde kalitesi hakkında fikir

[7] Farklı standartlar inkübasyon sıcaklığını farklı değerlerde verirler. Gıdaların standart mikrobiyolojik analizinde gıdanın genel mikrobiyolojik kalitesini belirlemek amacıyla ISO 4833'e göre 30 ^{o}C kullanılırken içme ve kullanma sularının standart mikrobiyolojik analizinde 22 ve 37 ^{o}C olmak 2 farklı inkübasyon sıcaklığı kullanılır. Buna bağlı olarak analizde kullanılan inkübasyon sıcaklığı, süresi ve inkübasyon atmosferi raporda belirtilmelidir.

verir. Howard yöntemiyle küflü saha sayımı da (bknz⇒ 08.05.02. bölüm) yine hammadde kalitesinin göstergesidir.

Gıda maddelerindeki toplam mezofilik aerop, toplam psikrofilik aerop, toplam termofilik aerop, toplam mezofilik anaerop, toplam psikrofilik anaerop, toplam termofilik anaerop vb. grupların varlığı, PCA besiyerine ekim, ilgili inkübasyon sıcaklığı, ilgili inkübasyon atmosferi ve ilgili inkübasyon süresi uygulanarak yapılabilir. Örneğin bir numunedeki toplam anaerobik termofil bakteri sayımı için ekim sonrası Petri kutularının anaerop atmosfer ortamında, belirlenmiş inkübasyon sıcaklığında, belirlenmiş süre ile inkübe edilmesi ve bunun sonunda oluşan kolonilerin sayılması gerekir. Bu analizde sadece termofil anaeropların değil aynı zamanda termodurik karakterli bazı fakültatif anaeropların da koloni oluşturabileceği unutulmamalıdır.

Gıdalarda toplam aerobik bakteri analizleri 14.02. bölümde verilmiştir.

09.06. Anaeroplar ve Mikroaerofiller

Gıdalarda bulunan anaeroplar denildiğinde akla ilk gelen *Clostridium* türleridir. Bunun dışında başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere fakültatif anaerop bakteriler de anaerop bakteri analizlerinde sıvı ya da katı besiyerlerinde gelişerek kendilerini gösterirler. Mayaların bir kısmı fakültatif anaerop olmakla birlikte toplam aerobik mezofilik bakteri analizinde olanın tersine olarak anaerobik bakteri analizlerinde genellikle gelişip koloni yapamazlar. Küflerin ise tamamına yakını aerop karakter gösterir.

Anaerop bakteriler, zorunlu (obligat) anaeroplar ve aerotolerantlar (ılımlı anaeroplar) olarak farklı gruplara ayrılırlar. *Enterobacteriaceae* üyeleri gibi fakültatif anaeroplar ise anaeropların bir alt grubu değildir ve örneğin PCA besiyerinde 28±2 ºC'ta 48 saat aerobik inkübasyon sonunda koloni oluştururlar.

Zorunlu anaeropların gelişmesi için atmosferde %0,5'ten daha az oksijen bulunmalıdır. Ilımlı anaeroplar %2-8 oksijen varlığında gelişebilirler. Tipik bir aerotolerant olan *Clostridium perfringens* ise normal atmosferik oksijen varlığında gelişebilir, ancak tüm anaerop analizleri standart olarak anaerobik ortamda yapılmalıdır. *Cl. perfringens* ile çalışılırken gıda numunesinin analize hazırlanması sırasında blender düşük devirde kullanılmalıdır.

Mikroaerofiller (kapneik bakteriler) anaeropların alt grubu olarak sınıflandırılmazlar. Bunlar, ayrı bir gruptur. Gıda mikrobiyolojisi açısından en tipik mikroaerofil örneği olan *Campylobacter jejuni* analizinde inkübasyon atmosferinde %5-6 O_2 ile %8-10 CO_2 olması gereklidir ve bu bakteri, standart aerobik ve anaerobik atmosferde gelişemez.

Saprofit anaeroplar genellikle proteinlerin yıkımı ile kötü kokulu ürünler oluşturarak gıdaları bozarlar. *Cl. perfringens* ve *Cl. botulinum* ise patojen anaerop türlerdir.

Arcobacter spp. (aerotolerant) ve *Desulfotomaculum* spp. (zorunlu anaerop), gıdalarda bulunabilen diğer anaerop bakterilere örnektir.

Gıdaların standart mikrobiyolojik analizinde anaeropların aranması ve sayılması genel olarak ekimi tamamlanmış PCA besiyerinin anaerop ortamda inkübasyonu ile yapılır. Anaeroplara özel başka besiyerleri de vardır. *Cl. perfringens* ve sülfit indirgeyen anaeropların analizinde bunlara özel besiyerleri kullanılır. Her ne kadar gıdalarda sülfit indirgeyen anaeropların büyük bölümü *Cl. perfringens* olsa da *Desulfotomaculum* spp. de sülfit indirgeyen bir bakteridir ve gıdalarda bozulmalara neden olur.

Gıdalarda toplam anaerop bakteri analizi genellikle kalite göstergesi iken doğrudan *Cl. perfringens* ve *Cl. botulinum* analizi halk sağlığını ilgilendirir. Çeşitli gıdalarda düşük sayıda olmak kaydı ile *Cl. perfringens* varlığına izin verilebilir. Ayrıca *Cl. perfringens*, fekal bulaş indikatörü olarak da değerlendirilebilir. Gıdalarda *Cl. botulinum* analizi yerine doğrudan botulin toksini analizi daha yaygındır.

Gıdalarda anaeropların analizi 14.03. bölümde, mikroaerofil karakterli *Camp. jejuni* analizi ise 14.15. bölümünde verilmiştir.

09.07. Mayalar ve Küfler

Doğada çok yaygın olarak bulunurlar. Her iki grup da ökaryot hücre yapısındadır ve fungi âlemi içinde yer alırlar. Mayalara flamentsiz mikrofunguslar, küflere flamentli mikrofunguslar da denilir. Hareketsizdirler, hafif asit ortamları (~pH 5,5) tercih ederler, ancak farklı türler dikkate alındığında, 2-9 gibi geniş bir pH aralığı ortaya çıkar. Optimum gelişme sıcaklıkları 25-28 ^{o}C'tır.

Mayalar, tek hücreli ve bir kısmı fakültatif aerop, diğerleri aerop karakterlidir. Küflerde hücrelerin arka arkaya dizilmesi ile ipliksi bir yapı olan hifler, hiflerin birbirine dolanması ile de miseller oluşur. Küfler, aerop karakterlidir. Her iki grupta da eşeyli ve eşeysiz çoğalma görülür. Eşeyli çoğalma aşaması olduğu henüz saptanamamış olan küfler, Fungi Imperfecti (*Deuteromyces*)[8] sınıfında yer alırlar.

Küfler, çok zengin bir enzim sistemine sahip oldukları için besin maddelerince çok yetersiz ortamlarda bile rahatlıkla gelişebilirler. Gerek duydukları B vitaminlerini kendileri sentezleyebilirler.

Sindirim yolu ile (gıdalarla birlikte) vücuda girdiklerinde enfeksiyona neden olan maya ve küf türü bugüne kadar saptanmamıştır. Mayalar arasında kadın

[8] *Deuteromyces* (*Deuteromycota*) sınıfı, bugüne kadar eşeyli çoğalma aşaması saptanamamış olan türlerin bulunduğu yığma bir sınıftır. Imperfecti deyişindeki mükemmel olmama, bu eksikliği belirtir.

hastalıklarına neden olan türler vardır. Küflerin oluşturduğu mikotoksinler, intoksikasyon olarak tanımlanır. Mayalar arasında intoksikasyona neden olduğu saptanmış tür de yoktur.

Küflerden pek çok enzim ve antibiyotik elde edilir. Mayalardan ise alkol fermantasyonlarında yararlanılır. Rokfor gibi özel olarak küf (*Penicillium roquefortii*) ile yapılan peynirler dışında gıdalarda maya ve küf bulunması kalite kaybı olarak görülür.

Çoğu maya ve küf, gıdalarda geliştiklerinde gıdaları bozar. Ozmofilik mayalar, su aktivitesi 0,6 olan yoğun şekerli pekmez gibi ürünlerde gelişebilirler. Kserofilik küfler ise kuru gıdalarda bozulmalara neden olurlar.

Meyve suyu sanayisinde standart pastörizasyon sıcaklık ve süresine, hatta daha yüksek değerlerdeki ısıl işlem uygulamalarına dirençli küf türleri, sorun çıkarabilmektedir. *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces flavus* ve *Eupenicillium brefeldianum*, gıda sanayisi açısından ısıya dirençli küf türleri olarak tanımlanır.

Çeşitli gıdalarda istenmeyen mikroorganizmalar olarak farklı türlerde maya ve küfler bulunabilir. Gıdaların standart analizinde uygulanan maya ve küf analizi, sadece kalite kriteridir. Buna göre maya ve küf analizi ile ilgili gıdanın standart kalitede olup olmadığı kontrol edilmiş olur.

Çoğu ulusal ve uluslararası standartta toplam maya ve küf sayısı dikkate alınırken özellikle ticarette maya ve küf sayısının ayrı ayrı analizi de istenebilmektedir. Maya ve küflerin koloni morfolojileri çok farklıdır ve kolaylıkla birbirlerinden ayrılabilir. Ayrıca mayalar çok genel olarak 24-48 saat inkübasyon sonunda koloni oluştururlarken bu süre küflerde 3-4 gündür.

Bir gıdadaki küf sayısı ya da varlığının analizi 2 günde de yapılabilir. Ancak bu analiz, özel bir hidrofobik ızgara membran filtrasyon (HGMF) düzeneği ile yapılabilir ve bu konu 08.02.05.01 bölümde açıklanmıştır. Standart küf analizi pek çok ulusal ve uluslararası standartta 5 gün olarak verilir. Çoğu küf türü aslında 4 günde koloni oluşturur, ancak geç gelişen küflerin de belirlenebilmesi ve özellikle "yok" sonucunun kesinleştirilmesi için inkübasyon 5 gün sürer.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında yapılan standart mikrobiyolojik analizler sırasında farklı besiyerlerinde 24 saatten dahi kısa bir süre içinde gelişip Petri kutusundan dışarıya taşan pembe renkli küf türü *Chrysonilia* (syn. *Monilia*) sp. olarak tanımlanmaktadır. Çok genel olarak havada yüksek nem olduğunda süt ve ürünleri işletmelerinin laboratuvarlarında görülür. Kimi kaynaklarda kırmızı ekmek küfü olarak da tanımlanır. İşletmeye bulaşıp ürünleri kontamine etme potansiyeli nedeniyle çok tehlikelidir. İnkübatörde 24 saat inkübasyon sonunda bu şekilde Petri kutusundan taşmış pembe/ kavuniçi renkli küf görüldüğünde;

-Her şeyden önce inkübatördeki mevcut tüm analizlerin feda edilmesi gerektiği kabul edilmelidir,

-Eğer inkübatör sıcaklığı 80 ºC'a ayarlanabiliyorsa inkübatör bu sıcaklığa ayarlanıp en az 2 saat bu sıcaklıkta (ya da 75 ºC'ta 4 saat veya 70 ºC'ta bir gece) tutularak küfün öldürülmesi yoluna gidilmelidir,

-İnkübatör, bu gibi yüksek sıcaklıklara çıkartılamıyor ise inkübatör kapağı olabildiğince çok az açılarak önce kapak çevresi 200 ppm aktif klor içeren dezenfektanla (örneğin, bu derişime seyreltilmiş çamaşır suyu ya da tercihen ticari yüzey dezenfektanı) ve "çiçek yaprak sulayıcı tabancası" olarak da tanımlanan basit bir pülverizatör kullanılarak dezenfekte edilmeli, devamında kapak olabildiğince ve sadece dezenfektan püskürtmeye yetecek kadar biraz daha fazla açılarak dezenfektan tüm inkübatöre püskürtülmelidir,

-Her mikrobiyoloji laboratuvarında yüzey dezenfektanlarının yüzeylere püskürtülmesi için basit bir pülverizatör bulunması gerekir,

-Eğer bu küf gelişimi Petri kutusundan henüz dışarı taşmamış aşamada fark edilirse de risk alınmamalı ve yukarıda açıklananlar uygulanmalıdır.

Gıdalara standart olarak uygulanan maya ve küf analizinde Petri kutusunda gelişen maya ve/veya küfün tür tanımlaması talebi çok genel olarak tümüyle gereksizdir. Kimi kaynaklarda özellikle "tarla küfü", "depo küfü", "makine küfü" gibi tanımlamalar yapılsa da gıdalardaki istenmeyen mikroorganizmalar açısından bunların pratik bir anlamı yoktur. Çünkü bozulmaya neden olma ya da daha doğru bir ifade ile gıdanın mikrobiyolojik kalitesi yaklaşımıyla standarda uygunsuzluk açısından bakıldığında ister tarla küfü ister depo küfü ve ister makine küfü olsun hiç fark etmez. Sorun çıkaran küfün cins ve tür olarak tanımlanması gıda sanayisinde çok genel olarak bir anlam ifade etmez, sonuçta bir hijyen eksiği vardır. Daha ileri bir tarihte başka tarla, depo, makine kaynaklı küf türleri de sorun çıkarabilir.

Maya ve küf analizleri 14.04. bölümde verilmiştir.

09.08. Toplam *Enterobacteriaceae*

Gram negatif, fakültatif anaerop, spor oluşturmayan, oksidaz negatif, katalaz pozitif, birkaç istisna dışında çok büyük çoğunluğu peritrik flagellaları ile hareketli ve 0,6-1,0 x 1,2-3,0 µm uzunluğunda çubuk bakterilerdir. Familya içinde 2016 yılı verilerine göre 53 cins altında 170'den fazla tür tanımlanmıştır. Doğada çok yaygın olarak bulunurlar. Çoğunun optimum gelişme sıcaklığı 30 ºC iken gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren türler, 37 ºC'ı tercih eder. Nötr ve nötre yakın pH'larda ve basit bileşimli besiyerlerinde kolaylıkla gelişirler. Tümü glikozdan gaz (CO_2:H_2= 2:1) ve asit oluştururlar.

Gıdalarda toplam *Enterobacteriaceae* varlığı doğrudan gıdanın mikrobiyolojik kalitesi ile ilişkilendirilir. *Enterobacteriaceae* sayısının steril olmayan pek çok gıdada belirli bir limit değer altında olması istenir.

Enterobacteriaceae, gıda mikrobiyolojisini en yüksek düzeyde ilgilendiren *Salmonella* spp., *Shigella* spp., koliform grup ve özellikle patojen olanlar dâhil tüm *E. coli* serotiplerini içeren çok geniş bir familyadır. Primer (birincil/ asıl) patojenler dışında pek çok fırsatçı patojen de bu familya içinde yer alır.

Familya isminin çıkış kaynağının *Enterobacter* cinsi olduğu tartışma konusudur. [Bağırsak kökenli bakteriler ailesi/ familyası] olarak tanımlanmış olmakla birlikte bu familyada bitki/ toprak kökenli bakteriler de vardır. İzleyen bölümde bu konuda daha ayrıntılı bilgi verilmiştir.

Gıdaların mikrobiyolojik kalite açısından değerlendirilmesinde toplam koliform grup yerine toplam *Enterobacteriaceae* varlığının (sayısının) belirlenmesi gerek ulusal gerek uluslararası ölçekte olmak üzere giderek daha fazla önem taşımaktadır. Bunun temel nedeni koliform grup bakterilerin, bu familya içinde çok küçük bir grubu oluşturmasıdır. Toplam *Enterobacteriaceae* analizi daha geniş bir grubu içerdiği için bir anlamda daha yüksek bir gıda mikrobiyolojisi kalite standardı sağlar.

Enterobacteriaceae analizi 14.05. bölümde verilmiştir.

09.09. Koliformlar, Fekal Koliformlar ve *E. coli*

Gıda mikrobiyolojisinde en önemli grup hiç kuşkusuz koliformlardır. Koliform grup bakteriler denildiğinde 37 ºC'ta 48 saat içinde laktozdan asit ve gaz oluşturan, Gram negatif, sporsuz ve çubuk şeklinde olan bakteriler anlaşılır. Bu tarife göre *Enterobacteriaceae* üyeleri olan *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Ent. cloacae*, *Citrobacter freundii* ve *Klebsiella pneumoniae* koliform grup bakteriler olarak tanımlanmış olur. *Enterobacteriaceae* üyelerinin tümü glikozdan asit ve gaz oluştururlar.

Bu grup üyelerinden *E. coli* dışındakiler, genellikle bitki/ toprak kaynaklıdır. *E. coli* ise doğada sadece sıcakkanlı hayvanların bağırsak sistemlerinde bulunduğu için[9] gıda, çevre vb. numunelerde bu bakteriye rastlanması, doğrudan fekal[10] (dışkı ile) bulaşmaya işaret eder. *E. coli* dışındaki koliform grup bakteriler arasında da dışkı kaynaklı olanlar vardır. Bunların tümü fekal koliform grup olarak tanımlanır. *E. coli* dışındaki koliform grup üyelerinden bitki/ toprak kaynaklı olanlar 44,0±0,1 ºC'ta gelişemez. Fekal kontaminasyonun (bulaşmanın) göstergesi olarak *E. coli*, en çok başvurulan bakteri olmakla birlikte bazı numunelerde *E. coli* olmasa bile diğer fekal koliformlara

[9] Sadece *E. coli* değil *Salmonella* gibi diğer enterik patojenlerin de doğal florası sıcakkanlı hayvanların bağırsak sistemidir. Bu ifade, tüm sıcak kanlı hayvanların bağırsak siteminde bu bakterilerin doğal olarak mutlaka bulunacağı anlamına gelmez.

[10] Fekal kelimesi, dışkı kaynaklı anlamındadır. Dolayısıyla fekal kaynaklı/ orijinli ifadeler tümüyle yanlıştır.

rastlanılmaktadır. Dolayısıyla uluslararası ticarette kimi zaman *E. coli* yerine fekal koliform[11] varlığı araştırılmaktadır. Basit olarak, ekimi yapılmış VRB agar 44±0,1 ºC'ta 24 saat inkübe edilir. Tipik koliform kolonileri fekal koliform olarak değerlendirilir ve tür tayinine gidilmesi gerekli değildir, analiz edilen numuneye doğrudan ya da dolaylı olarak sıcakkanlı hayvan dışkısı bulaşmıştır.

Koliform grup bakteriler, gıdalarda hijyen indikatörü olarak değerlendirilir. Grup üyeleri içinde primer patojen *E. coli* O157:H7 serotipi ile fırsatçı patojenler de bulunmaktadır. Bu nedenle gıdalarda koliform grup bakteri sayısının yüksek olması istenmez. Bazı gıdalarda belirli bir miktar numunede "yok" olması hedef alınırken pek çok gıdada bitki ve toprak kökenli koliformların belirli sayılarda bulunmasına izin verilmektedir. Buna göre koliform grup analizinde sayım ya da var/ yok testleri uygulanır.

Gıda sanayisinde yoğun tartışmalara neden olan konu, "*Kleb. pneumoniae* gibi fırsatçı patojenlere gıda numunesinde rastlandığında sağlık açısından nasıl bir yargıya varılacağıdır". Bir bakış açısına göre bu bakterinin rastlandığı gıda, bakteri sayısına bakılmaksızın insan sağlığı açısından tehlikeli olarak yorumlanır. Tersine olarak, çeşitli ulusal ve uluslararası standartlarda bazı gıdalarda *E. coli* hariç olmak üzere koliform bakterilerin <100 KOB/g(mL) sayıda bulunmasına izin verilir. Bu durumda bir katı besiyerinde ya da EMS yöntemiyle yapılan sayımda tür tanımlamasına gitmek gerekli değildir. Bu bakış açısına göre, fırsatçı patojen olarak değerlendirilse bile bir gıdada örneğin, 90 KOB/g(mL) *Kleb. pneumoniae* saptanırsa sorun yoktur.

E. coli denildiğinde tam olarak standart *E. coli* biyotip 1 anlaşılır. İndol negatif *E. coli* biyotip 2 nadir görülür, ancak bu da fekal kontaminasyonu gösterir. Bunlar, insanlarda ender olarak hastalıklara neden olurlar. *E. coli*, ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından bir çocuğun dışkısından izole edilmiş ve *Bacterium coli commune* olarak isimlendirilmiş, sonraları bu bakteriye *Escherichia coli* adı verilmiştir. Halk arasında koli basili olarak da bilinir. Önceleri bu bakteri sıcakkanlı hayvanların normal bağırsak florası ve bu özelliğinden ötürü sadece fekal kontaminasyon indeksi olarak kabul edilmiş iken 1940'lı yılların sonuna doğru diyareye neden olan *E. coli* serotiplerinin varlığının saptanması, 1950'li yılların ortalarında *Vibrio cholerae* toksinine benzer toksinlerinin bulunması ve nihayet insanları ve hayvanları ölüme kadar götürebilen patojen tiplerinin bulunması ile *E. coli* serotiplerine bakış açısı değişmiştir.

[11] Hollandalı tıp doktoru Christiaan Eijkman (1858-1930) tarafından ortaya konulan yöntem ile 44,5±0,2 ºC'ta gelişebilen tüm koliform üyeleri fekal koliform olarak tanımlanır. Bitki/ toprak kökenli olan koliformlar bu sıcaklıkta gelişemez. İnkübasyon sıcaklığı, önceki FDA BAM (Bacteriological Analytical Manual) standartlarında su ürünleri için 45,5±0,2 ºC olarak verilmiş iken 2017'de yapılan revizyon ile tüm gıda analizleri için 44,5±0,2 ºC olarak düzenlenmiştir. ISO 7251'e göre *E. coli* analizi önce 44,5±0,2 ºC'ta yapılırken 44±1,0 ºC olarak güncellenmiştir.

Bütün *E. coli* serotiplerinin doğal kaynağı sıcakkanlı hayvanların bağırsak sistemleridir. Buna bağlı olarak insanların ve hayvanların dışkıları ile toprak ve suya, dolayısıyla tüm çevreye yayılırlar. Sağım ve kesim işlemlerinde süte ve ete kolaylıkla bulaşabilirler. Hijyenik koşullara yeterince uyulmaması nedeni ile sıklıkla pek çok gıdada bulunabilirler.

Yukarıda da belirtildiği gibi herhangi bir gıda ya da çevre numunesinde *E. coli* ya da diğer fekal koliformlara rastlanması, o numuneye doğrudan ya da dolaylı olarak (kanalizasyon), sıcakkanlı hayvanların dışkısının bulaştığının kesin göstergesidir. Dışkı bulaşması ise pis/ temiz gibi göreceli kavramlar nedeni ile değil, tümüyle dışkıda primer patojenlerin bulunma potansiyelidir. Sağlıklı insanlar dahi bağırsaklarında *Salmonella* ve *Shigella* gibi primer patojenleri ve parazitleri barındırıp bunları dışkıları ile çevreye yayabilirler. Gıda ya da çevre kaynaklı olarak bu patojenler, vücuda girdiklerinde hastalanmalara ve ölümlere yol açabilirler. *E. coli*, sadece bu potansiyel tehlike nedeni ile istenmez.

E. coli, farklı antijenik özellikleri ile çok sayıda serotipe ayrılmaktadır. Bunların çoğu zararsız ve sıcakkanlı hayvan bağırsaklarının doğal florasında bulurken bazı serotipler insan ve hayvanlar için patojenite gösterir. Özellikle buzağı, kuzu, domuz yavruları ve civcivlerde önemli ekonomik kayıplara yol açabilen kolibasillosis etmenidir. İneklerde mastitis (meme yangısı), kedi ve köpeklerde idrar yolları enfeksiyonları sık rastlanan *E. coli* enfeksiyonlarıdır. Patojenik *E. coli* serotipleri insanlarda safra ve idrar yolları enfeksiyonları, menenjit, septisemi, artheriosklerosis (damar sertliği), hemolitik üremik sendrom (HUS), yara enfeksiyonları, çeşitli immünolojik hastalıklar ve karaciğer apsesi oluşturur. İnsanlarda nadiren septisemi yapar. Süt çocuklarında epidemik gastroenteritise (gastroenterit; mide bağırsak yangısı) neden olur.

-Not 1: Koliform grup bakterilerin analizinde inkübasyon sıcaklığı olarak yaygın bir şekilde 35-37 ^{o}C kullanılmakla beraber, uluslararası kuruluşlar tarafından 30-37 ^{o}C (ISO 4831) ve süt ürünleri analizi için 32 ^{o}C (FDA) inkübasyon sıcaklığı da önerilmektedir. Bunlardan 30-32 ^{o}C genel olarak proses kontrolü, 35-37 ^{o}C ise ürünün potansiyel sağlık riski taşıyıp taşımadığının belirlenmesi amacıyla seçilir. İlgili talimatta ve analiz raporunda inkübasyon sıcaklığının belirtilmesi kaydı ile bu sıcaklık derecelerinden herhangi birisi uygulanabilir.

-Not 2: Koliform grup bakteriler ve fekal koliformların analizinde kullanılan violet red bile (VRB) agar, son zamanlarda VRBL (violet red bile lactose) agar olarak anılmaktadır. Bu uygulamadaki amaç, *Enterobacteriaceae* sayımında kullanılan violet red bile dextrose (VRBD) agar ile karışıklık olmaması içindir.

-Not 3: Koliform grup bakteri analizlerinin çoğunda bu grubun laktozdan asit oluşturma özelliği esas alınır. Örneğin, koliform bakterilerin laktozdan asit oluşturması sonucunda VRB agar bileşimindeki pH indikatörü, kolonilerin koyu kırmızı renk oluşturmasını sağlar. Bazı gıdalarda başta glikoz olmak üzere laktozdan başka şekerler de vardır. Özellikle sıvı ve 1 mL ekim yapılan bu

gıdalarda koliform grup olmayan bazı bakteriler, laktoz dışındaki şekerlerden asit oluşturarak sahte pozitif sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle atipik görünümde olan koloniler ayrı ayrı brilliant green bile (BGB) brotha ekilerek burada 35-37 ºC'ta 24 saat içinde gaz oluşumu kontrol edilmelidir. Bu kontrol, yöntemin doğruluğunu onaylamak için 3'er ay aralıklarla tipik kolonilere de uygulanmalıdır.

-Not 4: Koliform grup bakteri analizlerinin çoğunda, bu grubun laktozdan gaz oluşturma özelliği esas alınır. Buna göre, lauryl sulfate (LST) broth ve BGB broth besiyeri tüplerindeki Durham tüplerinde biriken gaz, koliform grup bakteriler için tipik reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu besiyerlerinde, *Enterobacteriaceae* üyeleri başta olmak üzere, koliform grup dışında bazı bakteriler de gaz oluşturmadan gelişebilir. Bu nedenle koliformlar için tipik reaksiyon gelişmeye bağlı bulanıklık ve Durham tüpünde gaz görülmesidir.

Koliform grup bakteri analizi 14.06, fekal koliformların analizi 14.07 ve *E. coli* Biyotip 1 analizi 14.08. bölümlerde verilmiştir. 14.08. bölümde *E. coli* Biyotip 1 analizinde bu biyotipin üç temel fizyolojik özelliği (β-D-glucuronidase enzimi varlığına bağlı MUG pozitif olması, indol pozitif olması ve 44 ºC'ta gelişebilmesi) açıklanmıştır.

09.10. Enteropatojenik *E. coli* Serotipleri

Tanımı

Enteropatojenik *E. coli* serotipleri, ishal (diyare) etmeni olanlar ve gastrointestinal (mide ve bağırsak) sistemi dışındaki vücut bölgelerinde hastalığa neden olanlar (ExPEC: extraintestinal pathogenic *E. coli*) olarak iki grupta incelenebilir. İshale neden olanlar sulu bir diyareye yol açarlar. Bu grupta Shiga[12] toksin oluşturanlar ciddi bir ishale yol açabileceklerinin ötesinde, kalın bağırsak iltihaplarına ve ölüme kadar gidebilen hemolitik üremik sendroma (HUS) neden olabilir. ExPEC ise üriner sistem enfeksiyonu, yenidoğan menenjiti ve sepsis ile diğer vücut bölgelerinde enfeksiyonlara yol açar.

Bugün için bilinen en önemli gıda kaynaklı patojenlerden birisi bu bakterinin özel bir serotipi olan *E. coli* O157:H7'dir. *Salmonella* ile kıyaslandığında, çok daha az salgına neden olmakla beraber enterovirulent *E. coli* serotiplerinin virülens mekanizmaları, patojenik *Salmonella* serotiplerinden daha fazla bilinmektedir. 2011 bahar aylarında Almanya'dan başlayıp tüm Avrupa ülkelerini etkileyerek salgına neden olan bakteri, Enteroagregatif verotoksin oluşturan EAggEC VTEC O104:H4 olarak saptanmıştır.

[12] Basilli dizanteri etmeni *Shigella dysenteriae* tarafından oluşturulan toksin, bazı patojenik *E. coli* serotipleri tarafından da üretilir.

Daha önceden yapılan antibiyotik direnç çalışmalarında *E. coli* O157:H7 suşlarının pek çok antibiyotiğe duyarlı olduğu saptanmış iken daha yeni çalışmalar bu bakteride giderek bir antibiyotik direnç kazanımı olduğunu göstermiştir. Tüm patojenlerin antibiyotiklere giderek daha fazla direnç kazanması, halk sağlığı açısından çok ciddi bir tehdit olarak görülmektedir.

Ekolojisi

Bütün *E. coli* serotiplerinde olduğu gibi enteropatojenik *E. coli* serotiplerinin de doğal yaşam alanları sıcakkanlı hayvanların bağırsak sistemleridir. Dışkı ile çevreye geçen patojen, bir şekilde gıda ve su kaynaklarına bulaşarak hastalıklara neden olur.

Yapılan çeşitli çalışmalarda süt ineklerinin dışkılarında bu bakteriye diğer büyükbaş hayvanlara kıyasla kayda değer ölçüde daha fazla rastlanmıştır. Başka araştırmalarda ise deneysel olarak *E. coli* O157:H7 aşılanmış civcivlerin 8 ay süre ile *E. coli* O157:H7'yi dışkıları ile attıkları gösterilmiştir. Bu bulgular, süt ineklerinin ve kümes hayvanlarının *E. coli* O157:H7'nin temel kaynağı olduğu düşüncesini ortaya çıkartmıştır. Devamında *E. coli* O157:H7'nin süt sığırlarının dışkısında 5 ^{o}C'ta 70 gün süre ile canlılığını koruduğu saptanmıştır. Bu bulguya göre sığır dışkısının sığırlara, gıdalara ve çevreye *E. coli* O157:H7'nin yayılmasında potansiyel bir taşıyıcı olduğu, dolayısıyla ahırlarda dışkının iyi bir şekilde kontrol edilmesi gerektiği gösterilmiştir.

Sınıflandırılması

Çok sayıda patojen *E. coli* grubu bulunmaktadır ve farkı kaynaklar bu grupları farklı şekillerde sınıflandırmaktadırlar. Bunlar içinde enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroinvaziv (enteroinvasive) *E. coli* (EIEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olmak üzere 4 grup önem taşımaktadır. Başka kaynaklar ise patojenik *E. coli* serotiplerini enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve diffuse-adhering *E. coli* (DAEC) olarak 6 gruba ayırmıştır.

2017 yılında yayımlanmış bir başka kaynağa göre patojen *E. coli* serotipleri enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), diffuse-adhering *E. coli* (DAEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroagregatif *E. coli* (EAggEC; EAEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) ve adherent invasive *E. coli* (AIEC) olmak üzere 6 gruba ayrılır. Bu kaynak, EHEC grubunu göstermemiş, ancak STEC grubunu O157:H7 STEC, non-O157 STEC ve Shiga-toxin producing enteroagregatif *E. coli* (STEAEC) olmak üzere 3 alt gruba bölmüştür.

Kimi kaynaklar bu grupların dışında nadir görülen facultatively enteropathogenic *E. coli* (FEEC) grubuna da değinir.

Yaygın olarak kabul gören sınıflandırma şeklinde ise patojenik tüm *E. coli* serotipleri verotoksijenik (= verositotoksijenik VTEC) grubu içinde toplanır.

Vero, Afrika yeşil maymunu böbreğidir ve çeşitli toksikolojik deneyler vero doku kültürü ile yapılır.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve Kontrolü

E. coli O157:H7 serotipi, diğer *E. coli* serotiplerinden ≥ 44,0 ºC'ta gelişememe, MUG (bknz⇒ 14.08. bölüm) negatif olma ve sorbitolü 48 saat içinde fermente edememe gibi farklılıklar gösterir. Safra tuzlarına diğer *E. coli* serotiplerinden daha düşük direnç gösterir. Diğer patojenlere kıyasla aside daha fazla direnç göstermesi bu serotipin önemini artırmaktadır.

E. coli O157:H7 serotipi de diğer *E. coli* serotipleri gibi optimum olarak 37 ºC'ta ve pH 7,2'de gelişir. Bu serotip üzerine yapılan çalışmaların çoğu bu serotipin gıdalarda varlığının gösterilmesi (izolasyonu) ve baskılanmasına yöneliktir.

E. coli O157:H7'nin gelişebildiği optimum sıcaklık sınırları 24 saatte 24,3-41,0 ºC olarak bulunmuştur[13]. Enterohemorajik *E. coli*, süt ve kıymada düşük sayıda refakatçi flora varlığında 8 ºC'ta gelişebilmekte, ancak bu sıcaklıkta yüksek sayıda refakatçi flora varlığında gelişme olmamaktadır. Yüksek sayıdaki refakatçi flora, enterohemorajik *E. coli* serotiplerinin gelişmesini engellemekte, yüksek refakatçi flora varlığı veya 5 ºC sıcaklıkta gelişme olmasa dahi canlılık korunmakta, 5 ºC'ta tutulan gıdalarda risk devam etmekte, 8 ºC ve üzerindeki sıcaklıklarda ise risk artmaktadır.

E. coli O157:H7 suşları radyasyon uygulamalarına çok duyarlıdır ve D_{10} değeri 0,241-0,307 kGy arasında değişir. 2,5 kGy radyasyon uygulaması 10^8 sayıdaki *E. coli* O157:H7'yi inaktive eder ve bu düzeydeki inaktivasyonun köftelerde bulunabilecek daha az sayıdaki bakteri için tümüyle inaktivasyon anlamına gelir. ABD'nin bazı eyaletlerinde *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının yaygınlaşması nedeni ile donmuş hamburger ışınlanmasına 1998 yılında izin verilmiştir.

Gıda kaynaklı hemorajik kolit vakalarının önemli etmeni olan *E. coli* O157:H7'nin aside toleransı midenin kuvvetli asit ortamından geçerken kendisine avantaj sağlar. Ayrıca mayonez, sucuk gibi fermente etler, cottage peyniri gibi asitli gıdalarda diğer patojenler inhibe olurken *E. coli* O157:H7 gelişebilir. pH'sı 3,6-4,0 olan elma şarabında 8 ºC'ta 31 gün canlı kalabilir. %40'dan fazla mayonez içeren ve pH'sı 5,40-6,07 olan et salatasında canlılığını uzun süre koruyabildiği, hatta et salatasının karakteristik pH'sında gelişebildiği gösterilmiştir. Fermente sosislerin üretim aşamaları olan laktik asit

[13] Herhangi bir mikroorganizmanın sıcaklık, pH, A_s, O/R potansiyeli vb. hertürlü belirli bir yaşam gereksiniminde optimumdan sapmadaki davranışı ve minimum/ maksimum sınırların belirlenmesinde diğer tüm parametrelerin optimum koşullarda tutulması gerekir. Her türlü antimikrobiyel maddeye karşı direnç araştırmaları da diğer tüm koşulların optimumda tutulması koşulunda belirlenir. Gıda güvenliği açısından engeller teknolojisi araştırmalarında ise birden fazla optimum koşul sapması hedef alınır (bknz ⇒ 12. Bölüm)

bakteri starter kültür ilavesi ve pH 4,5'te fermantasyon, kurutma ve 4 ºC'ta 2 ay depolama sonrasında canlılığında sadece 100 misli bir azalma görülmüştür.

E. coli O157:H7, %6,5 NaCl'de gelişebilir. NaCl'ün inhibisyon etkisi %8,5 derişimde başlar, 200 ppm nitrit ve %4,0 NaCl içeren pH'sı 5,6 olan sıvı besiyerinde gelişebilir, %3,5 NaCl ve 69 ppm sodyum nitritli ve pH'sı 4,8 olan fermente sucukta indirgenir, ancak tümüyle inhibe olmaz.

Salmonella inaktivasyonu için uygulanan ısıl işlem *E. coli* O157:H7 serotipini de inaktive etmeye yeterlidir. Yapılan termal inaktivasyon çalışmalarına göre sığır etinde *E. coli* O157:H7'nin D değeri 54,4 ºC'ta 2390 saniye, 60 ºC'ta 50 saniye ve 64,3 ºC'ta 9,6 saniyedir ve D değeri *Salmonella* spp.'den daha düşüktür. Bu çerçevede sütün pastörizasyonu ve et pişirmede orta (soğuk) noktanın sıcaklığının 68,3 ºC'a çıkması, bu bakterinin öldürülmesi için yeterlidir.

Diğer tüm gıda kaynaklı patojenlerde olduğu gibi *E. coli* O157:H7 ve diğer enterovirulent *E. coli* enfeksiyonlarından korunmanın ön koşulu, gıda üretiminde ve tüketiminde temel gıda güvenliği kurallarına uyulmasıdır. Basitçe, yeterli ısıtma ve soğutma, çapraz kontaminasyonların engellenmesi, çiğ yenilen salataların iyi bir şekilde yıkanması çok ciddi şekilde kontrol sağlar.

Patojenitesi ve Önemli Serotipler

Diyarejenik *E. coli* serotiplerinin (DEC) neden olduğu gıda kaynaklı hastalıkların klinik, halk sağlığı ve ekonomik önemi vardır. Bunlar Enterovirulent *E. coli* serotipleri (EEC) olarak da adlandırılırlar. Yüzlerce farklı *E. coli* serotipi bulunmakla beraber bunlardan patojen olanların sayısı 30 kadardır.

ETEC serotipleri, gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda görülen ishallerin başlıca nedenidir. Seyahat diyaresine de sıklıkla neden olur. Bu nedenle yaptığı hastalık gastroenteritis ya da turist ishali olarak tanımlanır. ETEC suşları ısıya dirençli (Heat Stabile Toxin= ST) ve ısıya duyarlı (Heat Labile Toxin= LT) olmak üzere bir ya da daha fazla enterotoksin oluştururlar. ST'ler 100 ºC'ta 15 dk'lık ısıl işleme ve aside dirençli iken LT'ler 60 ºC'ta 30 dk'lık ısıl işlem ile tahrip olurlar ve bunlar aside duyarlıdırlar. Bu toksinler koleradan daha hafif ancak yine de oldukça sert geçen sulu bir diyareye yol açar. Karın krampları, hafif bir ateş yükselmesi, mide bulanması ve kırgınlık/ keyifsizlik tipik semptomlardır. Kusma nadir görülür. Isıya duyarlı toksinin molekül ağırlığı 86.000 Dalton'dur (Da), yapısal ve antijenik olarak kolera toksinine benzer. Isıya dirençli toksinler STa ve STb olarak iki tipe ayrılırlar. Bunların molekül ağırlıkları sırasıyla 2000 Da ve 5000 Da'dur.

Hastalığın inkübasyon süresi, toksinin salgılanmasına göre 12-72 saattir. Genellikle 1-7 gün, gelişmemiş ülkelerdeki bakımsız çocuklarda 4 haftaya kadar sürer ve beslenme bozukluklarına neden olur. Bu suşlar, ince bağırsağa tutunma ve kolonizasyon için özel bir yapışma fimbriası içerirler.

İnce bağırsakta mukoz hücrelere yapışır. O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128ac, O148, O159 ve O167 serotipleri bu gruba girer. İnsanlar bu grubun temel taşıyıcısıdırlar. Hastalık genellikle su ve gıdalar ile bulaşır. Gönüllüler ile yapılan denemelerde enfektif doz 10^8-10^{10} bakteri olarak saptanmıştır. Bu sayı çocuklarda çok daha azdır. Hastalık sırasında çok sayıda bakteri dışkı ile atılır. ETEC serotiplerinin yaptığı hastalıklara gıda üretiminde yeterli sanitasyona uyan gelişmiş ülkelerde çok nadir olarak rastlanır.

EPEC serotipleri, sert geçen sulu ve kanlı diyareye neden olurlar. Bu hastalıklar çocuk diyaresi olarak da adlandırılırlar. İnsan başlıca kaynaktır. O55, O86, O111ab, O119, O125ac, O126, O128ab, O142 serotipleri bu gruba girerler. Bazı EPEC suşları bir ya da daha çok sitotoksin üretirler. Bu grup bakterilerde tipik enterotoksin salgılanmasına benzemeyen bir virülens mekanizması bulunur. Sulu diyarede bakterilerin yapışması sonucunda ince bağırsağın tümünde fiziksel bir değişiklik olur. Kanlı diyare ise yapışma ve akut doku tahribatı ile *Shigella dysenteria* verotoksinine benzer bir toksin salgılanması nedeni ile görülür. EPEC serotipleri çocuklarda çok etkilidir ve çok az sayıda bakteri enfektif olabilmektedir. Erginlerde hastalığın ortaya çıkması için gereken en düşük sayı $>10^6$ bakteri olarak saptanmıştır. EPEC serotiplerine daha çok gelişmemiş ülkelerde rastlanır. Bazen uzayan diyare, dehidrasyona ve sonra elektrolit dengesizliğine yol açabilir ve ölüm görülebilir. Üçüncü dünya ülkelerinde ölüm oranı %50'dir. Süt çocuklarında biberonun kontamine su ile yıkanması ve/veya mamaların kontamine su ile hazırlanması hastalığın ortaya çıkışında en önemli nedenlerden birisidir. Dolayısı ile kreşler bu ülkelerde salgınların çıkış yeri olarak görülmektedir.

EIEC serotipleri ise genellikle laktoz negatif ya da laktoz geç pozitif ile hareketsiz olma gibi atipik özellikler taşırlar ve *Shigella* türleri ile antijenik olarak yakınlık gösterirler. *Shigella*'da olduğu gibi basilli dizanteri ve ishal yaparlar. Dışkı mukoit ve bazen kanlı olur. Hafif geçen bir dizanteriyi andırır ve çoğu kez *Shigella* türlerinin yaptığı dizanteri ile karıştırılır. Kalın bağırsakta lokalize olurlar, burada epitel hücrelere girerek çoğalırlar ve bu hücreleri öldürürler. Bunlar enterotoksin üretmezler, patojenite mekanizmaları *Shigella*'ya benzer. Temel taşıyıcı insandır. O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 ve O167 serotipleri EIEC grubu içinde yer alır. Bunlardan en sık rastlanan O124 serogrubudur. EIEC serotiplerinin neden olduğu diyare enfekte gıdanın tüketiminden 12-72 saat sonra ortaya çıkar. Karın krampları, ishal, kusma, ateş, üşüme ve genel halsizlik hastalığın tipik belirtileridir. Hastalığın ilerlemesi genellikle (ve özellikle çocuklarda) hemolitik üremik sendroma yol açar. EIEC serotiplerinde hastalığın ortaya çıkması için 10 canlı hücrenin yeterli olduğu sanılmaktadır.

EHEC serotipleri olarak tanımlanan grubun başlıca üyesi *E. coli* O157:H7'dir ve ilk kez 1982 yılında gıda kaynaklı hemorajik (kanamalı) kolitis (bağırsak iltihabı) etmeni olarak izole edilmiştir. Daha sonraları izole edilen kanlı diyare etmeni O126:H11, O103, O104, O111 ve sorbitol pozitif O157:H^- EHEC olarak

tanımlanmışlardır. Tüm EHEC suşları, Vero hücreleri doku kültürüne sitotoksik olan bir ya da daha fazla sayıda toksin (Vero Toksin= VT) veya *Shigella* benzeri toksinler (Shiga like toxin= SLT) üretirler. SLT, *Shigella dysenteria* tip 1 tarafından üretilen Shiga Toxin'e (ST) benzemesi nedeniyle daha sonraları pek çok *E. coli* serotipinin de VT ürettiği belirlenmiş ve bunlar Vero Toxin üreten *E. coli* anlamında VTEC veya Shiga benzeri Toxin üreten *E. coli* anlamında SLTEC olarak gruplandırılmışlardır. *E. coli* O157'nin indol negatif mutantlarına rastlanmıştır

Bu serotipler arasında O26:H11 gibi kanlı diyare ve böbrek yetmezliğine neden olan serotipler vardır. 2011 Mayıs ayı öncesinde gıda kaynaklı tek VTEC serotipi O157:H7 olarak bilinirken *E. coli* O104:H4'ün büyük bir salgına neden olması dikkat çekici bir değişme olarak kabul edilmektedir. EHEC suşları hemorajik kolit etmenidirler. Bu hastalıkta dışkıda kan görülür, giderek dışkı tümüyle kandan oluşur. Bununla beraber bazı hastalarda sadece diyare görülmektedir. Karın ağrısı, apandisit ağrısına çok benzediği için bazı vakalarda hastaların apandisleri alınmıştır. Bazen kusma görülür, ateş yoktur ya da çok azdır. Daha az yaygın olan şekli ise hemolitik üremik sendrom (HUS)'dur. HUS, en fazla ölüme neden olan hastalıktır. Bu hastalıkta akut nefropati (böbrek yetmezliği), thrombocytopaenia (trombositlerin düşük sirkülasyonu) ve microangiopathic hemolitik anemi (kansızlık, anormal daralmış kanallardan geçen eritrositlerin mekanik olarak zarar görmesi sonunda eritrositlerin introvasküler koagülasyonu) olmak üzere üç semptom gösterir. Bu serotipin neden olduğu bir diğer hastalık ise trombositopenik purpura (TTP)'dır. TTP klinik ve patolojik özellikleri HUS'a benzer, ancak merkezi sinir sistemi bozukluğu genellikle temel belirtidir. Hastalarda beyinde kan pıhtısı oluşur ve genellikle ölüm görülür. Hastalığın inkübasyon süresi çok değişkendir ve 2-8 hatta bazen 12 günde ortaya çıkar. Ölüm, tıbbi problemlere bağlı olarak daha çok yaşlılarda görülmektedir. Özellikle risk gruplarında hemorajik kolitisin HUS'a dönüşmesinden sakınılmalıdır. İlaç tedavisi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Hastalığın ortaya çıkması için *Shigella*'da olduğu gibi 10 (hatta <1) canlı hücrenin yeterli olduğu sanılmaktadır. Kişiden kişiye bulaşmanın yaygın olması bu tahminin asıl nedenidir. Salgın hastalıklardan sonra yapılan çalışmalar, bu salgınlara 0,3-15 EMS/g canlı hücre saptanan donmuş köftelerin ve 0,3-4 EMS/g canlı hücre saptanan salamların neden olduğunu göstermiştir.

ABD Philadelphia eyaletinde 1971 yılında 5 erişkin hastada izlenen klinik seyir, bilinen bağırsak hastalıkları ile açıklanamamış ve hiçbir etiyolojik etken saptanamayan benzer hastalıkların, ABD'nin diğer eyaletleri ile Avrupa ve Japonya'da da ihbar edilmesi üzerine ABD Hastalık Denetim ve Önleme Merkezleri (CDC), geriye dönük olarak 300 *E. coli* suşunu serotiplendirmiş ve kanamalı ağır diyare geçiren California'lı 50 yaşında bir kadından izole edilen bakteriyi, *E. coli* O157:H7 olarak saptamıştır.

1985 yılı Eylül ayında Ontorio'da görülen şiddetli hemorajik kolit salgınında bir yaşlı bakım evindeki 55 kişi ve 18 çalışanda ishal görülmüş, bunlardan yaşları 78-99 arasında değişen 17 kişi ölmüştür. 38 hasta, 37 işçi ve 10 ölüden alınan örneklerde bütün enterik patojenler aranmıştır. 38 hastanın 19'unda verotoksin üreten *E. coli* (VTEC)'ye rastlanırken 10 ölüden alınan örneklerde bu bakteri görülmemiştir. Hiçbir örnekte başka bir enterik patojene rastlanılmamıştır. 19 hastadan izole edilen *E. coli* izolatlarının 18'inin *E. coli* O157:H7 olduğu belirlenmiştir.

Patojenik *E. coli* suşlarının yayılmasında insandan insana bulaşma oldukça önemlidir. Seyahat diyaresi denilen küçük çaplı salgınlar bu şekilde bir yayılma sonucu olur.

Anaokulu ve kreşler ile bakım evleri gibi yerlerde de kişiden kişiye yayılma sıklıkla görülmektedir. ETEC, EIEC ve EPEC serotiplerinin başlıca kaynağının insan olduğu yukarıda belirtilmiştir. Patojenik grupların gıdalarda bulunma sıklığı üzerinde yapılan araştırmalar farklı sonuçları göstermektedir.

Hastalık/ Serotip İlişkisi

E. coli O157:H7 olmayan VTEC suşlarının giderek HUS ve diyareli hastalardan daha fazla izole edildiği ve çeşitli ülkelerde sığır popülasyonu üzerinde yapılan çalışmalarda temel kaynak konumunda olan sığırlardan 100'den daha fazla serotip izole edildiği belirtilmektedir.

Patojenik *E. coli* suşlarının yayılmasında insandan insana bulaşma oldukça önemlidir. Seyahat diyaresi denilen küçük çaplı salgınlar bu şekilde bir yayılma sonucu olur.

Anaokulu ve kreşler ile bakım evleri gibi yerlerde de kişiden kişiye yayılma sıklıkla görülmektedir. ETEC, EIEC ve EPEC serotiplerinin başlıca kaynağının insan olduğu yukarıda belirtilmiştir. Patojenik grupların gıdalarda bulunma sıklığı üzerinde yapılan araştırmalar farklı sonuçları göstermektedir.

Enfeksiyona Aracı olan Gıdalar

Doğrudan veya dolaylı olarak dışkı ile bulaşmış tüm gıdalar *E. coli* enfeksiyonlarında aracı gıdalar olarak tanımlanabilir. Bunlar arasında özellikle çiğ yenilen salatalar, pişirildikten sonra tekrar ısıtılmadan yenilen yemekler ve yeterince ısıl işlem görmeden tüketilen gıdalar, diğer patojen türlerde olduğu gibi *E. coli* enfeksiyonlarında da önemlidir.

Japonya'da 1996 yaz aylarında görülüp etkisini 1998 yılına kadar sürdüren *E. coli* O157:H7 salgınının, salatalara çiğ olarak konulan turp filizinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. 50 kişinin öldüğü 2011 Almanya salgınında, *E. coli* O104:H4 kaynağı çemen otu filizi olarak saptanmıştır.

Her ne kadar *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının başlıca sorumluları arasında sığır kıyması gösteriliyor ise de oldukça seyrek olarak görülen vakalarda risk

faktörü hakkında oldukça az bilgi vardır. İlginç olarak ayaküstü (fast food) restoranlarda çalışanların yüksek riske sahip olmadıkları ve kıyma tüketimine bağlı olarak enfeksiyon riskinin artmadığı gösterilmiştir. Bununla beraber yeterli pişirilmemiş et tüketimi ile *E. coli* O157:H7 enfeksiyonu arasında bir ilişki olduğu da açıktır.

E. coli O157:H7 salgınlarında kişiden kişiye bulaşmaların birinci derecede önemli olduğu, salgının yayılmasında yaşlı bakım evi, sağlık ocağı ve kreş gibi yerlerin sorumlu olduğu açık bir şekilde gösterilmiştir.

Batı Avrupa ülkeleri ile ABD'de yaygın tüketimi olan ve ayaküstü restoran ve büfelerde satılan taze sıkılmış elma suyu ve elma şarabı da *E. coli* enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Elma suyu ve elma şarabının enfeksiyonlara yol açmasının nedeni, hayvanların otladığı alanlardaki elma ağaçlarından yere dökülmüş ve kontamine olmuş elmaların kullanılmasıdır. Yine *E. coli* O157:H7 serotipi için yeterli pişmemiş hamburger en önemli gıda iken çiğ süt tüketimi de çeşitli salgınlara neden olmuştur. EHEC serotiplerine inek memesinde rastlanılması sütün bu konudaki önemini ortaya koyarken sağlıklı hayvanların dışkılarında bu bakteriye az sayıda rastlanması, buna karşı aynı sürünün kesimi ve özellikle işlenme sonrasında pozitif örnek sayısının artması mezbahalarda çapraz kontaminasyonun ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Bunların dışında kontamine suyun içilmesi, kullanılması ya da bu sularda yüzülmesi ile de hastalık ortaya çıkmaktadır.

Bireysel vakalar dışında *E. coli* O157:H7 ilk olarak 1982 yılında ABD'de Oregon'da 26 ve Michigan'da 21 olmak üzere 47 vaka ile ve her ikisi de yine daha öncekilere benzemeyen kanlı diyare şeklinde 2 salgın ile görülmüştür. Her iki salgında da köfteli sandviçlerin yenilmesinin hastalığa neden olduğu belirlenirken salgınların birinde aynı partiye ait donmuş köftelerde *E. coli* O157:H7'ye rastlanmıştır. Bundan hemen sonra benzer vakalar ABD, Kanada ve İngiltere'de görülmüş, daha sonra Meksika, Çin, Arjantin, Belçika gibi ülkelerde de aynı hastalığa rastlanmış, 1996 yaz aylarında ise Japonya'da 27 kişinin ölümüne ve yüzlerce kişide hastalığa neden olan salgının etmeni *E. coli* O157:H7 olarak gösterilmiştir.

Eylül 1983'te ABD Washington D.C.'de 45 kişinin Fransa'dan ithal edilen Brie peynirinden kaynaklanan benzer semptomlar taşıyan sulu diyare (%91) ve karın krampları (%80) göstermesi üzerine yapılan çalışmalarda hastalık etkeninin ısıya dayanıklı enterotoksin üreten *E. coli* O27:H20 olduğu saptanmıştır. Benzer hastalıklar kısa bir süre sonra ve yine peynirden kaynaklanmak üzere ABD'nin 4 eyaletinde daha görülmüştür. ABD'de görülen ve ETEC serotiplerinin neden olduğu en büyük salgınlar Meksika restoranında enfekte işçi tarafından hazırlanan yemeği yiyen 415 kişinin hastalanması, Miami'den kalkan yolcu gemisinde muhtemelen yengeç salatasının neden olduğu ve gemidekilerin 1/3'ünün hastalanması, Texas'ta hastanedeki yemeği yiyen 3000 kişiden 282'sinin hastalanması şeklindedir. Brezilya'da sığır eti, hamburger ve sosislerden yapılan analizlerde sırasıyla %5; %7,5 ve %10

ETEC suşlarına rastlanmıştır. Buna karşın ABD'de 78 peynir örneğinde ETEC suşları bulunamamıştır. EIEC serotipleri ise yine ABD'de ve Fransa'dan ithal edilen peynirler ile salgına neden olmuştur. EIEC ve EPEC suşlarına nadir olarak gıdalarda rastlanılmıştır. EHEC suşlarına ise sığır kıymasında rastlanılmaktadır.

E. coli O157:H7 vakalarının çoğunda yeterince pişirilmemiş sığır kıyması hastalığa neden olmuştur. ABD'de bir lisede 1988 Ekim ayında görülen ve toplam 1562 öğrencinin 32'sinin (%2) *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu hemorajik kolite yakalandığı vakada hasta çocukların büyük çoğunluğunun aynı gün okul kantininde ön pişirilmiş ve dondurulmuş köfte yedikleri saptanmıştır. Aynı gün tüm okuldaki öğrencilerin %8'inin aynı köfteden yedikleri tahmin edilmiş, üretici firmanın aynı tarihli ürünlerinde *E. coli* bulunmuş, ancak *E. coli* O157:H7 bulunamamıştır.

İngiltere'de 1990 Eylül ayında üçü aynı lokantadan yiyen olmak üzere 16 kişide kanlı diyare görülmüş, bunlardan biri diyalize alınmış, tümünün dışkılarında *E. coli* O157:H7 bulunmuş, ancak lokantada aynı bakteriye rastlanılmamıştır.

Japonya'da 1996 yaz aylarında görülen salgının ise "daikon sprouts" denilen (turp filizi) 8-10 cm uzunluğunda salatalara ve yemeklere garnitür olarak katılan hatta doğrudan kendisi salata olarak tüketilen bir gıdadan başladığı tahmin edilmiştir. Bakteriye her ikisi de Japonya'ya özgü olan ve elle hazırlanan lokum benzeri bir tatlı ile "O-benta" denilen ve pilav, çiğ balık, turşu, salata, piliç veya domuz eti ile yapılan bir yemekte de rastlanılmıştır.

E. coli O157:H7 salgınları günümüzde de sürmektedir. 2016 Mart ayında ABD'de bir keçi çiftliğini ziyaret eden 7 kişi hastalanmıştır.

Diğer serotipler için belirli gıdalar potansiyel tehlike oluşturmamaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi hasta kişilerin dışkılarının bulaştığı tüm gıdalar aynı derecede risk taşımaktadır.

Serolojisi

E. coli suşları arasında serolojik bir bağlantı olduğu ilk kez 1921'de Dodgeon ve arkadaşları tarafından belirtilmiş, sonra 1937'de Lowel, *E. coli*'nin kapsül ve somatik olmak üzere 2 çeşit antijeni olduğunu ileri sürmüştür. 1943'te ise Kaufmann flagella antijenini de göstermiştir.

2016 yılı verilerine göre *E. coli* serotiplerinde, 186 (kimi kaynaklara göre 185) somatik O antijeni ve 53 flagella H antijeni belirlenmiştir. Kapsül K antijenlerinin belirlenmesi, ancak çok gelişmiş laboratuvarlarda yapılabildiği için serolojik sınıflandırmada bugün için kullanılmamaktadır. 186 O antijeni ve 53 H antijeni saptanmış olması, *E. coli* için 186 x 53 farklı serogrup olduğu anlamına gelmez. Bu tarihte 80 kapsül antijeni olduğu belirtilmektedir, ancak oldukça yeni ve farklı kaynaklarda tüm antijenlerin sayısı hakkında farklı veriler olduğuna dikkat çekilmektedir. *E. coli* serotiplerinin sayısı, bu kitabın bilimsel içeriği dışındadır.

E. coli somatik O antijenleri ile *Salmonella, Shigella, Citrobacter* ve *Providencia* cinsi bakteriler arasında önemli ölçüde çapraz reaksiyonlar bulunmaktadır. Termostabil özellik gösteren O antijenlerinden en çok 25 kadarına rastlanır. Hücre zarında, kılıfında ya da kapsülde bulunan kapsül K antijenleri L, B ve A grubundadır. Bunlardan L ve B grubu yüzeysel somatik antijenler, A grubu ise kapsül antijenleridir. K antijenleri de termostabil özellik gösterir. Kapsül antijenleri içinde ayrıca Vi, a, ß ve F antijenleri de vardır. H antijenleri sadece hareketli türlerde bulunur ve ısıya duyarlıdır. Flagellar H antijenleri birbirleri ve diğer bakterilerin H antijenleri ile çapraz reaksiyon vermezler.

2011 Almanya O104 Salgını

2011 bahar aylarında Almanya'da başlayan ve mayıs ayında en yüksek düzeye çıkan, sadece Avrupa değil ABD ve Kanada'ya da sıçrayan salgında toplam 50 kişi ölmüştür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre HUS ve EHEC vaka/ ölüm sayısı aşağıdadır.

Ülke	HUS		EHEC	
	Vaka	Ölüm	Vaka	Ölüm
ABD	4	1	2	0
Almanya	857	32	3078	16
Danimarka	10	0	15	0
Fransa	7	0	10	0
Hollanda	4	0	7	0
İngiltere	3	0	4	0
İsveç	18	1	35	0
Diğer ülkeler	5	0	16	0
Toplam	908	34	3167	16

Bu salgın, diğerlerinden çok farklı olmak üzere orta yaştaki (ortalama 46 yaş) kadınları etkilemiştir. Hastalananların %68'i kadındır. Bunun nedeni, yaklaşan yaz mevsimine bağlı kilo verme isteği ve beslenme desteği olarak aşırı salata tüketimi gösterilmiştir. Almanlar, organik gıda tutkunudur ve klor vb dezenfektan uygulamasını benimsemezler.

Hastalığın kaynağı olarak Alman yetkilileri tarafından önce İspanya'dan ithal edilen hıyar gösterilmiş, ancak daha sonra bu bildirişin yanlış olduğu anlaşılmış ve sonuçta Almanya, İspanya'ya bu yanlış bildirim sonrasında ciddi tazminat ödemiştir. Daha sonra Mısır ya da Hindistan kaynaklı çemen otu, salgından sorumlu gıda olarak belirlenmiştir.

Bu salgın kaynağının yeterince erken olarak belirlenememe nedeni, bir anlamda ev ve küçük salata dükkânları kökenli olmasıdır. Toprağı ile birlikte

pazarlanan bu ithal ürün, sadece sulanarak yetiştirilmiş ve filizleri kesilerek doğrudan tüketilmiştir[14].

E. coli O104:H4 serotipinin 2004 yılında Güney Kore'de bir HUS hastasından izole edildiği bildirilmiştir. Başka kaynaklar bu serotipin 2001 yılında Almanya'da, 2006'da Kore'de, 2009'da Gürcistan'da ve 2010'da Finlandiya'da izole edildiğini belirtmektedir.

E. coli O157:H7 analizi 14.09. bölümde verilmiştir.

09.11. *Salmonella*

Avrupa Birliği ülkelerinde piliç ve ürünlerinde uygulanmakta olan kurallar, 2018 sonbaharında Türkiye'de de yürürlüğe konulmuştur. Buna göre piliç ve ürünlerinde *Salmonella* izole edilirse serotiplendirmeye gidilmekte, *Salmonella* Enteritidis ya da *Salmonella* Typhimurium dışındaki tüm serotiplerin varlığı durumunda bu ürünlerin halk sağlığı açısından tehdit oluşturmayacağı gerekçesi ile pazarlanmasına izin verilmektedir. Avrupa Birliği ülkelerinde yılda 100.000 *Salmonella* vakası bildirilmektedir.

Tanımı

Enterobacteriaceae üyesi olan *Salmonella* Gram negatif, fakültatif anaerop, çubuk şeklinde bakteri olarak bu familyanın temel karakteristiklerini taşır. *Salmonella* 0,7-1,5 x 2-5 μm boyutlarında, düz, uçları hafif yuvarlak çubuk bakterilerdir. Spor ve kapsül oluşturmazlar. Anilin boyaları ile kolaylıkla boyanırlar. Optimum gelişme sıcaklıkları 37 °C ve optimum gelişme pH'ları 7,4'tür.

Salmonella olarak tanımlanan ilk patojen üye *Salmonella* Typhi'dir. İlk kez 1880 yılında görülmüş, 1884 yılında Gaffky tarafından izole edilmiştir. 1885 yılında Salmon ve Smithy, *Salmonella* Choleraesuis'i izole etmiş ve bu cinse *Salmonella* adı verilmiştir.

Salmonella cinsi içinde patojenite ile ilgili üç grup bulunmaktadır.

-Tek bir konakçıya özgü, tifo ve paratifo gibi tifo benzeri hastalık yapan serovarlar. *S*. Typhi, *S*. Sendai ve *S*. Paratyphi A, B ve C sadece insanlarda, *S*. Gallinarum ve *S*. Pullorum sadece kümes hayvanlarında hastalık yapar.

-Bir konakçı türle ilişkili olan, ancak diğer konakçı türlerde de hastalığa neden olan konakçıya adapte serovarlar. *S*. Choleraesuis ve *S*. Typhisuis bu gruba girer.

[14] Evlerde taze tüketime olanak sağlayacak şekilde tohum ve toprak içeren ambalaj (örneğin maydanoz), balkonda ara sıra sulanır, yeşeren yapraklar hasat edilerek hergün taze sebze elde edilir. Günümüz Türkiyesinde de bu uygulama giderek yaygınlaşmaktadır.

-Nadiren sistemik enfeksiyonlara neden olan, fakat geniş bir yelpazede hayvanların sindirim sisteminde kolonize olabilen, geniş konakçı aralığı olan serovarlar. Bu grupta, *S*. Typhimurium ve *S*. Enteritidis en yaygın serotiplerdir. Bu serovarların büyük çoğunluğu tifo yapmayan serotipler (Nontyphoidal serovars: NTS) olarak tanımlanır.

Salmonella, genel olarak koliform grup mikroorganizmalarla yoğun kontamine olmuş gıdalarda bulunur. Ancak bazı özel durumlarda koliform grup mikroorganizma bulunmayan örneklerde *Salmonella* spp.'ye rastlanabilir.

Kolonileri genellikle 2-4 mm çapındadır, fakat bazıları (*S.* Abortus-equi*, S.* Typhisuis ve *S.* Abortus-ovis) 1 mm çapında koloni oluşturur. Birçok suş, özel gelişme faktörlerine gerek olmadan basit ortamlarda kolaylıkla gelişir. *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum dışındakiler peritrik flagellaları ile hareketlidirler[15]. Tümü glikozu asit oluşturarak katabolize eder. *S.* Typhi ve *S.* Gallinarum hariç olmak üzere tüm serotipler glikozdan gaz oluştururlar.

Salmonella spp., gıda kaynaklı hastalıklara neden olan diğer patojenlerden bazı gıdalarda sıklıkla bulunması, pek çok gıdada oldukça geniş bir sıcaklık sınırında gelişerek sayılarını artırabilmeleri, kişiden kişiye bulaşma ve yayılma özelliğinde olmaları ve iyileşmeden sonra taşıma evresi olarak tanımlanan uzun bir süre dışkı ile atılmaları gibi farklar gösterirler.

Ekolojisi

Salmonella, gıda maddesinin florasında primer veya sekonder kontaminasyon sonucu bulunabilir. Örneğin, gıda maddesi kıyma ise *Salmonella* taşıyan bir hayvanın mezbahada kesimi sonucu etmen, ete doğrudan yani hayvandan geçmiş olup buna primer kontaminasyon denilir. Halk arasında *Salmonella* enfeksiyonunun yaygınlaşmasında sekonder bulaşma daha fazla önem taşır. Etmenin, beslenme sistemi aracılığı ile insan vücuduna girmesine neden olan gıda maddesi sekonder olarak etrafı, alet ve ekipmanı, mutfaklarda ise tabak, çatal, bıçak gibi mutfak malzemesini kontamine eder. İnsan eli primer kontaminasyonun sekonder kontaminasyona çevrilmesinde büyük rol oynar. Kontamine olmuş gıda maddesine dokunan çıplak bir el, etmenin her tarafa yayılmasına, insanlara, çevreye ve diğer gıdalara bulaşmasına neden olur. Bu şekildeki bulaşmaya çapraz (kros) kontaminasyon da denilir. Salmonellosis enfeksiyon zincirinde halkaların çok fazla olması, onun dünya problemi haline gelmesine neden olmuştur. *Salmonella* spp. doğada çok yaygın olarak her yerde bulunur ve bu nedenle enfeksiyon zincirinin halkaları da fazladır.

Yem→ hayvan→ gıda maddesi→ insan enfeksiyon zinciriyle veya daha uzun olan hayvan→ yem→ hayvan→ lağım suyu→ gıda maddesi→ atık su→ insan enfeksiyon zinciriyle etmen, sonuç olarak daima insana ulaşır.

[15]Sadece kümes hayvanlarında patojen olan *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum serotiplerinin hareketsiz olması göz ardı edilerek, *Salmonella* analizine 1 gün kazandırılmaktadır (Bknz⇒ 14.10.01 Salmonella var/yok analizi bölümü).

Salmonella spp. toprakta, havada, suda, lağım ve atık sularda, hayvanlarda, insanlarda, hayvan yemlerinde, insan gıdalarında, alet ve ekipman ile bazı meyve ve sebzelerde bulunur. Başta ve özellikle kümes hayvanları ve domuz olmak üzere hayvanlarda yaygın bir şekilde görülür. Su, toprak, böcekler, fabrika ve mutfakların tezgâh yüzeyleri, hayvan dışkıları, çiğ kırmızı ve beyaz etler, çiğ süt, çiğ deniz ürünleri bu bakterinin doğal olarak bulunduğu yerlerin sadece birkaçıdır. Sular, atık sular, hayvan yemleri, depo zararlıları olarak kemiriciler, böcekler, kuşlar, evcil ve yabani hayvanların hepsi enfeksiyonun yayılmasında etkendir.

Doğal habitatları, sıcakkanlı hayvanlar olarak tanımlanan memelilerin ve kanatlıların (kümes hayvanları ve kuşlar) bağırsak sistemleridir. Böceklerin sindirim sistemlerinde de ara sıra *Salmonella* görülür. Primer kaynağı insanlar ve hayvanlardır. Taşıyıcı insan ve hayvanların dışkıları ile doğaya salınıp dışkı ile temas eden her şeyi bulaştırırlar. İnsanlar taşıyıcı olarak enfeksiyonların potansiyel kaynağıdırlar. İngiltere'de her an 50.000 kişinin, dışkıları ile *Salmonella* ifraz ettikleri tahmin edilmektedir. İnsan dışı kaynakların başında hayvan yemleri, sığır, domuz gibi hayvanlar ve ürünleri, piliç eti ve yumurta gelmektedir. Doğal bulunma yerleri bağırsaklar olmakla birlikte hayvanlar doğduklarında bağırsakları *Salmonella* içermezler. Hayvan yavruları da insan yavruları gibi *Salmonella* spp.'ye çok hassas oldukları için doğumdan bir süre sonra yemlerle bulaşma olmaktadır.

İnsanlara bulaşma, havyan yetiştiriciliğinin zorunlu kıldığı ilişki sonucu, direkt dokunma ile olabildiği gibi çiğ ve az pişmiş gıda tüketimi ile de olmaktadır. Mezbahaya giden hayvanlara bulaşması ise çeşitli yollardan olur. İçinde birlikte yaşadıkları sürü, beslendikleri yem ve su, ilk düşünülecek kontaminasyon kaynaklarıdır. Ayrıca insanlardan, vahşi hayvanlardan, kemiricilerden, topraktan ve bitkilerden de bulaşması olasıdır. Yapılan araştırmalar, sürüdeki *Salmonella* pozitif hayvan sayısının kesim ile 3 misli arttığını, ürüne işleme aşamasında da karkasa göre pozitif sonuç veren ürün sayısının 3 misli arttığını göstermiştir. Bir diğer deyiş ile kesim ve işleme sırasında küçümsenemeyecek boyutta çapraz bulaşmalar olmaktadır.

Sağlıklı sığırların kesim sonrasında işkembelerinde %45 düzeyinde pozitif sonuç alınması hayvan beslemenin bu konudaki önemini ortaya koymaktadır. Yemlerde en sık görülen serotipler *S.* Seftenberg, *S.* Montevideo ve *S.* Cerro iken *S.* Enteritidis'e bugüne kadar yemlerde rastlanılmamıştır[16].

S. enterica türünün alt türleri olan *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenee*, *indica* ve *bongori* türleri, genellikle soğukkanlı hayvanlardan ve çevreden, nadiren de insanlardan izole edilir.

[16] Biyolojide kesinlik yoktur. Bugüne kadar rastlanılmamış olması daha sonra da rastlanılmayacağı anlamına gelmez.

Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Salmonella adlandırılması diğer mikroorganizmalardan farklıdır. Standart adlandırmada cins ile tür ismi kullanılır ve tüm kelimeler italik yazılır. *Salmonella* ise tümüyle serotipler[17] ile ifade edilir. Buna göre serotip ismi büyük harfle ve italik olmadan yazılır.

Basit bir örnekle, açık yazılışı *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *typhimurium* yerine bu serotip, basitçe ve güncel kullanım olarak *Salmonella* Typhimurium olarak ifade edilir. Bu açık yazılıştaki serovar yerine, pathovar ve biovar kullanımları da görülmektedir.

Salmonella sınıflandırması üzerinde yoğun çalışmalar devam etmektedir. Kaufmann-White şeması olarak bilinen serotiplendirmeye göre somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerine göre serotiplere ayrılır. Somatik ve flagellar antijenlerine bağlı olarak değişik serotipler (serovarlar) gösteren *Salmonella* için 1964 yılında sadece 900 olan serotip sayısı, 1966 yılında 1000'e, 1974 yılında 1700'e, 1994 yılında 2375'e ve 1995 yılında ise 2500'e çıkmıştır. Bu sayı, 2007 yılında 2579 ve en son olarak 2014 tarihli kaynağa göre 2659 olmuştur.

Söz konusu kaynağa göre *Salmonella* cinsi içinde 2 tür vardır: *Salmonella enterica* (2637 serotip) ve *Salmonella bongori* (22 serotip). *Salmonella enterica* türü içinde 6 alt tür bulunmaktadır: (1) *Salmonella enterica* subspecies *enterica* 1586 serotip, (2) *Salmonella enterica* subspecies *salamae* 522 serotip, (3a) *Salmonella enterica* subspecies *arizonae* 102 serotip, (3b) *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* 338 serotip, (4) *Salmonella enterica* subspecies *houtenae* 76 serotip ve (5) *Salmonella enterica* subspecies *indica* 13 serotip.

Bu kitapta taksonomi ayrıntısına girilmemiştir. Genetik çalışmalardaki ilerlemeler, mikroorganizma taksonomisini her gün değiştirmektedir. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren serotiplerin tamamına yakını *Salmonella enterica* subspecies *enterica* alt türü içindedir.

Serotiplendirme esaslı isimlendirme aşağıda "Serolojisi" bölümünde verilmiştir.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve Kontrolü

Salmonella üyeleri ekstrem çevre koşullarına hızla adapte olabilen "esnek" mikroorganizmalar olarak bilinir. *Salmonella* spp.'nin çoğu minimal besiyeri olarak tanımlanan ve azot kaynağı olarak amonyum azotu, karbon kaynağı olarak glikoz ile mineral maddeleri içeren basit besiyerlerinde gelişebilirler.

Az sayıda suş gelişme faktörlerine gereksinme gösterir. Genellikle seçici ve zor beğenen mikroorganizmalar değillerdir.

[17] Serotip, serolojik (antijen-antikor) reaksiyonlarına göre ayrılan ve genel olarak alttür altı mikroorganizma gruplarını tanımlar.

Gelişmeleri için optimum pH istemleri 6,5-7,5 olmakla beraber minimum olarak pH 4,0 ve maksimum olarak pH 9,0 arasında gelişebilirler.

Çoğu insan patojeni gibi *Salmonella* türleri de insan vücut sıcaklığı olan 37 ^{o}C'ı yeğler. Ancak gelişme sıcaklığı 5-47 ^{o}C'lara kadar uzanmaktadır. Hücrelerin soğuk koşullara önceden adaptasyonu ile donma noktasına yakın (chilled) derecede soğutulmuş gıdalarda gelişmesini sürdürebilir. *S.* Typhimurium'un kıymada 2 ^{o}C'ta 24 saat içinde, piliç kıymasında yine 2 ^{o}C'ta 48 saat içinde, *S.* Enteritidis'in yumurta kabuğunda 4 ^{o}C'ta 10 günden daha az bir sürede gelişebildiği saptanmıştır. *Salmonella* spp.'nin gıdada gelişmesi söz konusu olduğunda minimum gelişme sıcaklığının besiyerindekinden 2-4 ^{o}C daha yüksek olması gerekir[18]. Saf kültür halinde düşük sıcaklıklarda rahatlıkla gelişebildiği halde gıdada bulunan mikroflora içinde özellikle psikrofillerle rekabet edemedikleri için gelişimleri diğer mikroorganizmalar tarafından baskılanır. Özellikle laktik asit bakterilerinin oluşturdukları laktik asit ve bakteriyosin gibi metabolitlerle *Salmonella* gelişimi kolaylıkla engellenir. Dolayısıyla, laktik asit fermantasyonu ve olgunlaşma süreci geçiren Beyaz peynir ve sucuk gibi gıdalarda salmonellosis riski oldukça düşüktür.

Gelişmeleri için gerekli olan en düşük su aktivitesi değeri A_s 0,94 olarak bildirilmiştir. Tuz, *Salmonella* gelişmesini engellemekle beraber etkili konsantrasyonu sıcaklığa ve gıdanın gördüğü işlemlere bağlı olarak değişir. %3-4 NaCl konsantrasyonunda inhibe olur. Bununla beraber bazı serotipler için bu oran %7 olarak verilmektedir.

Salmonella spp.'nin doğal habitatları bağırsak sistemi olduğu için doğaya salındıktan sonraki yeni konumlarında canlılıklarını sürdürebilmeleri önemlidir. Doğal olmayan yeni çevrelerine ne derece uyum gösterebildiklerini anlamak amacıyla çeşitli araştırmalar yürütülmüştür.

Gıdalarda canlı kalmaları ise gıdanın cinsine ve muhafaza koşullarına göre değişir. Etlerde canlı kalabilmelerini etkileyen faktörler arasında su aktivitesi ve sıcaklık derecesi gelir. Yumurtanın kurutulması sırasında canlı hücre sayısındaki kayıp fazla olmaz. Kurutma işlemi sonrasında canlılıklarını uzun süre koruyabilirler. Canlılık, düşük sıcaklıklarda daha uzun süre korunur.

Salmonella ve salmonellosisin kontrolü için gerekli önlemler benzer tüm patojenler için geçerli olan bulaşmanın engellenmesi, gelişmeye engel olunması ve organizmaların yok edilmesinden ibarettir.

Salmonella spp.'nin dağılımı ve yaygın oluşu nedeni ile gıdalara bulaşmasına tümüyle engel olmak çok zordur. Özellikle tüketilmeye hazır gıdalar bu konuda büyük önem taşır. Buzdolabında (4-5 ^{o}C'ta) saklama *Salmonella* çoğalmasını engellemekle beraber tehlike karakteristiğini iyileştirmez.

[18] Mikroorganizmaların sıcaklık, pH vb. minimum ve maksimum gelişme sınırları genellikle laboratuvar ortamında ve diğer gelişme faktörleri optimum koşulda iken belirlenir.

Salmonella düşük pH'lı (pH <4,5) gıdalarda gelişemez. Bazı gıdaların korunmasında asitlik faktöründen yararlanılabilir. Ancak düşük pH'lı bazı gıdalarda *Salmonella* gelişmesi önlense dahi bu bakterinin canlılığını koruyabileceği unutulmamalıdır. Kuşkusuz, daha yüksek asitlikler, daha fazla öldürücü olur ve bu kural tüm patojenler için geçerlidir.

Nitekim Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde tamamlanan bir doktora çalışmasında (Savran, 2017) geleneksel yoğurt kültürü ile *S.* Enteritidis, süte beraberce aşılanmış, inkübasyon sonrasındaki farklı sıcaklık ve sürelerde depolama sonunda pH 4,5 altındaki yoğurtlarda bile *S.* Enteritidis'in canlılığını koruduğu görülmüştür. Yine Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde tamamlanan bir yüksek lisans çalışmasında ise (Selamoğlu, 2017), *S.* Enteritidis serotipinin pH 4,33'te canlılığını koruduğu gösterilmiştir.

Genel olarak *Salmonella* spp.'nin yok edilmesinde temel yöntem ısı uygulamasıdır. Bazı dayanıklı serotipler dikkate alınmaz ise 62,8 ^{o}C'ta[19] 68,4 sn ısıl işlem uygulaması, patojenik *Salmonella* serotiplerini yok etmeye yeterlidir. Sütlerin pastörizasyonunda uygulanan (63,3 ^{o}C'ta 30 dk, 71,7 ^{o}C'ta 16 sn) ısıl işlem, sütün mL'sindeki *Salmonella* sayısının $3x10^{12}$'yi geçmediği sürece yeterlidir. Sütün mL'sindeki *Salmonella* sayısı $3x10^{12}$, sadece teorik (kuramsal) bir değerdir, sütün mL'sindeki *Salmonella* sayısı 10^{8}'e eriştiğinde süt, zaten pıhtılaşır.

Salmonella, standart pişirme sırasında genellikle yok olur. Fırında pişen gıdalarda en soğuk nokta sıcaklığı 71,1 ^{o}C'a ulaşır veya aşarsa bu gıdalar *Salmonella* açısından riskli olmaktan kurtulurlar. *Salmonella* serotipleri içinde ısıl işleme en dirençli serotiplerden biri olan *S.* Senftenberg 775 W suşu, *S.* Typhimurium'a göre ısıl işleme 30 kat daha fazla dayanıklıdır. 44 ^{o}C'ta gelişen serotiplerin ısıl işleme daha dayanıklı oldukları saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar dondurulmuş bütün yumurtada 5 kGy radyasyon uygulaması ile *S.* Typhimurium'da 7 logaritma birimi canlılık azalması sağlandığını göstermiştir. Aynı serotip için kemikli ette 5-8 logaritma birimi canlılık azalması için 5-7,5 kGy dozunda ışınlamaya gerek vardır.

Hayvanlarda *Salmonella* bulaşması ve yayılmasını kontrol için pek çok önlem vardır. Bunlar arasında canlı ve kesilmiş hayvan ithalatının kontrolü, *Salmonella* spp.'den ari yem kullanılması ve hayvancılıkta hijyenik koşulların sağlanması en önemlileridir.

Tüketicilerin ve gıda işleyicilerin potansiyel tehlike olan et ve diğer çiğ ürünlerin taşınması, işlenmesi ve pişirilmesi konularındaki eğitimleri çok yüksek derece önemlidir. Gıdaların doğru pişirilmesi ve yeterli soğutulması gibi temel gıda işleme tekniklerinin her düzeyde bilinmesi gereklidir. Genel olarak *Salmonella*

[19] 62,8 ^{o}C olarak verilen değer orijinal olarak 145 ^{o}F'tır.

enfeksiyonları, bakterinin zaten var olduğu çiğ ya da yeterli pişmemiş gıdaların tüketimi ile artar.

Her ne kadar yeterli pişirme, ısıl işleme dirençli olmayan *S*. Enteriditis ve *S*. Typhimurium riskini ortadan kaldırmakta ise de yumurtanın kaynar suya kırılması (çılbır) ve az kaynatılması gibi geleneksel pişirme yöntemleri genel olarak yetersiz kabul edilir. Yapılan araştırmalar, yumurtanın her türlü pişirme şeklinde sarısının sıvı halde kalması durumunda düşük sayılardaki varlıklarında dahi *S*. Enteriditis PT4'ün canlılığını koruduğunu kanıtlamıştır. Bu ve bunun gibi araştırma sonuçlarına bağlı olarak hastane yemeklerinde çiğ ve az pişmiş yumurta servisi yapılmaz.

Salmonella enfeksiyonlarının önlenmesinde bir diğer önemli konu çapraz kontaminasyondur. Pişmiş gıdaların çiğ gıdalarla kontaminasyonunun (bulaşmasının) önlenmesi ile enfeksiyon riski kayda değer ölçüde azaltılabilir.

Tüketicilerin diğer çiğ hayvansal gıdalarda olduğu gibi doğrudan çiğ yumurta ya da çiğ yumurta içeren gıdaları tüketmeleri *Salmonella* enfeksiyonları açısından risklidir. Benzer şekilde çiğ yumurtalar diğer çiğ hayvansal ürünler gibi işlenmeli, 7,2 ^{o}C veya daha altında depolanmalıdır. Çiğ yumurta tüketiminin özellikle hasta, yaşlı, çocuk ve hamileler için riskli olduğu unutulmamalıdır. Çiğ yumurta kullanılarak yapılan ev dondurmaları, ev mayonezi gibi gıdaların *Salmonella* enfeksiyonları açısından potansiyel tehlike olduğu unutulmamalıdır. Ticari olarak üretilmiş mayonez ve salata sosları, pastörize edilmiş yumurta kullanılması ve patojen *Salmonella* serotiplerinin gelişemeyeceği düzeyde asitlendirilmiş olması kaydı ile güvenlidir.

Salmonella serotiplerinin minimal enfeksiyon dozu serotiplere göre değişkenlik gösterir. Her ne kadar gönüllüler üzerinde yapılan deneylerde daha yüksek sayılar elde edilmiş ise de salgınlar sonunda tüketilmiş gıdalardan arta kalan ve/veya yasal olarak muhafaza edilmiş numunelerinde elde edilen değerler 10^{1}-10^{9} KOB gibi geniş bir dağılım göstermiştir. Tüketime hazır soğutulmuş gıdalarda soğuk zincirin kırılması her zaman risktir. Soğuk/ donmuş gıda zincirindeki kırılmaların oluşturacağı riskler bu kitabın 12. Gıda Güvenliği bölümünde açıklanmıştır.

Patojenitesi ve Önemli Serotipler

Klasik bir gıda enfeksiyonu olarak bilinen salmonellosis etmeni *Salmonella* spp.'nin gıda mikrobiyolojisindeki önemi büyüktür. *Salmonella* kaynaklı gastroenterit de ölümle sonuçlanabilir. Hastalık genel olarak 5 yaş altındaki çocuklarda görülür. *Salmonella* spp.'nin oluşturduğu hastalıklarda semptomlar ayrı ayrı ve birbirlerini izleyerek ortaya çıkabildiği gibi bütün semptomlar aynı anda belirerek sendrom şeklinde de ortaya çıkabilir. Salmonellosiste taşıyıcı (belirtisiz) evre, enterik ateş, gastroenterit, septisemi olmak üzere 4 evre görülür.

Enfeksiyonun ortaya çıkması için genellikle vücuda yüksek sayıda canlı ve patojenik *Salmonella* hücresi alınması gerektiği fikri yaygındır. Bağırsaklarda enfeksiyona neden olmaları onların mide asitliğini aşarak bağırsaklara ulaşmaları ile mümkündür. Salgıları ile pH'sı 2 civarında olan mide, beslenme yolu ile alınan az sayıda *Salmonella* spp.'nin yok olmasında etkendir. Dolayısıyla gıda ile alınan mikroorganizma sayısının yüksek olması gerekmektedir. İnce bağırsağa ulaşan patojenik *Salmonella*, bağırsak epiteline yapışarak burada yaşayıp çoğalmaya devam eder ve yayılmasını sürdürür. Enfeksiyon, mide bağırsak yangısı (gastroenterit) olarak ortaya çıkar. Ölüm olayı erişkin ve sağlıklı insanlarda nadir görüldüğü halde çocuk ve yaşlılarda ölüm oranı artar. Serotiplerin ölüm olaylarında önemi çok fazladır, çünkü serotiplerin virulensi oldukça büyük farklılıklar gösterir. Geçmiş yıllarda toplanan verilere göre *S*. Choleraesuis enfeksiyonlarında ölüm oranı diğerlerine göre 4-5 kez daha yüksek bulunmuştur.

Bugün 2600'ü geçen sayıda *Salmonella* serotipi olmakla beraber insanlar için patojen olan *Salmonella* serotipi sayısı ancak 50 kadardır. Minimal enfeksiyon dozu hastanın yaşı ve genel sağlık durumu, serotip ve suş farklılıkları gibi etkenlere göre değişir. Tüm yaş grupları potansiyel olarak hastalığa yakalanabilir. Diğer gıda kaynaklı enfeksiyonlarda olduğu gibi semptomlar (hastalık emareleri/ göstergeleri) yaşlılar, bebekler, gebeler ve özellikle bağışıklık hastalarında daha sert olarak ortaya çıkar.

Salmonella enfeksiyonlarında hastalığın tipik inkübasyon süresi 12-36 saat arasında değişir. Nadiren bu sürenin 5 saate düştüğü ve 72 saate kadar uzadığı görülmüştür. İlk belirtiler baş ağrısı, halsizlik, kusma, mideden başlayarak aşağılara doğru yayılan şiddetli karın ağrısı, nadiren 38 ^{o}C'ı aşan bir ateş ve diyaredir. Sersemlik hali, adale ağrıları ve üşüme nöbetleri sıklıkla görülen durumlar değildir. Hastalığın akut semptomları bulantı, kusma, karın krampları, ishal, ateş ve baş ağrısıdır. Akut semptomlar genellikle 1-2 gün sürerken hastanın yaşı ve genel sağlık durumuna göre bu süre uzayabilir. Bunu izleyen arterit (eklem yangısı) gibi kronik semptomlar akut hastalığın ortaya çıkışından sonra 3-4 haftaya kadar sürebilir.

Çoğu hastada hastalık 7 gün sürer. Salmonellosisin akut evresi 2-3 gün içerisinde atlatılır, eğer 2-3 günden uzun sürerse vücut fazlaca su kaybederek iyice güçten düşer ve tıpta kuruma/ solma anlamına gelen eksikoz durumu meydana gelir. Zayıf bünyeli hastalarda akut ve özellikle sert geçen diyare var ise rehidrasyon gerekebilir.

Salmonellosis çoğunlukla gözle görülebilir bir iyileşme ile sonuçlanır. Ancak hasta insan veya hayvan, klinik bulgulara göre sağlıklı olarak değerlendirildiği halde, canlı etmen henüz organizmadan tamamen uzaklaşmamış olabilir ve bağırsakların belli yerlerine, safrakesesi, karaciğer hatta böbrek gibi organların herhangi bir yerinde yerleşerek çeşitli salgılarla sürekli salınabilir. *Salmonella* septisemisi, enfeksiyon sonrasında her organda görülebilir. Bu durumda çevre, hasta olarak bilinmeyen ifrazatçının tehdidi altındadır. Bu durum haftalarca,

aylarca ve bazı hallerde yıllarca sürebilir. *Salmonella* enfeksiyonlarının yaygınlığının bir nedeni de budur.

Diyare aşamasında kişisel hijyen önemlidir. Bu kişilerin gıda ile teması önlenmelidir. Hastaların %90'dan fazlası enfeksiyondan 10 hafta hatta daha sonrasına kadar dışkıları ile *Salmonella* ifraz ederlerken az sayıda hastada *Salmonella* taşıma ve dışkı ile *Salmonella* ifrazı birkaç haftada son bulur. *S*. Enteritidis ile ciddi komplikasyon olarak ve her biri uygun antibiyotik tedavisi gerektiren akut böbrek yetmezliği, osteomiyelit (kemik iliği iltihabı) ve menenjit vakaları olduğu rapor edilmiştir.

Salmonella enfeksiyonlarının çoğunda genellikle tedaviye gerek kalmaz. Sadece gastrointestinal sorunlar görülür ise antibiyotik uygulaması önerilmez. Bazen antibiyotik kullanımı ters etki bile yapabilir. Vücut fazla su kaybettiği için tedavi olarak yalnızca sıvı kaybı dengelenir ve elektrolitik denge düzenlenir.

İnsanlarda hastalık yapan *Salmonella* serotiplerinin başında *S*. Typhimurium, *S*. Enteritidis ve *S*. Newport gelir. Yıllara ve coğrafyaya göre diğer serotipler insan ve başta sığır olmak üzere hayvan salmonellosisinde ön sıraya çıkar. *S*. Dublin, sığırlarda ve çiğ sütte en yaygın görülen serotiplerdendir.

Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Başta ve özellikle piliç olmak üzere beyaz ve kırmızı et, yumurta, ısıl işlem görmemiş süt ve ürünleri ile fekal kontaminasyona maruz kalmış her türlü gıda salmonellosis etmeni olabilir.

Salmonella spp.'nin en çok bulunduğu gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler gelir. Bunlar arasında kümes hayvanları eti, kıyma, sosisler, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, pastane ürünleri, süttozu ve krema *Salmonella* açısından önemli gıdalardır. Bunların yanında çeşitli soslar ve salatalar, pudingler ve diğer süt ürünleri de *Salmonella* riski taşıyan gıdalardır. Hammadde, işleme teknolojisi ve depolama/ pazarlama koşullarının yetersizliği *Salmonella* riskinin artmasına neden olur.

Tahıl ürünleri, sebzeler, su ürünleri, ısıl işlem görmüş süt ve süt ürünleri, *Salmonella* enfeksiyonlarında beyaz et, kırmızı et ve yumurta ürünleri yanında daha önemsizdir. Bununla beraber balık, midye, karides, kurbağa bacağı, soslar ve salata sosları, kremalı tatlılar ve soslar, kurutulmuş jelatin, yerfıstığı ezmesi, kakao ve çikolata *Salmonella* spp.'nin en çok görüldüğü gıdalar arasındadır. Avrupa ülkelerinde tüketimi yaygın olan ve ekmek üzerine sürülebilir yumuşaklıkta çiğ sucuk benzeri et ürünleri, yetersiz sıcaklıkta kızartılmış etler, yumuşak peynirler, dondurma, kremşanti, kaymak gibi süt ürünleri ve ayrıca pişirilmiş hazır olarak satılan bütün gıdalar ile şarküteri ürünleri *Salmonella* enfeksiyonlarında aracı gıdalar olarak sayılabilir.

Salmonella, yüksek asitli gıdalar dışında hemen tüm gıda maddelerinde bulunabilir. Primer enfeksiyon kaynağı dikkate alındığında öncelikle hayvansal ürünler *Salmonella* açısından risk taşımakla beraber, bitkisel ürünler ise

öncelikle lağım suyu ve/veya lağım suyu bulaşmış kaynak ve kuyu suları ile sulandığında *Salmonella* ile kontamine olur. Türkiye'de döner vb. gıdaların yanında verilen garnitür yeşil salata bu açıdan büyük risk taşımaktadır. Bunların dışında, gıda işletmelerinde hijyenik koşullara yeterince uyulmaması nedeni ile çalışanlar tarafından da gıdalar kontamine olmaktadır.

Önceki yılarda Türkiye çıkışlı tahin helvalarında *Salmonella* saptanmış ve bu bulaşma hızlı alarm sistemi üzerinden tüm dünyaya duyurulmuştu. Günümüzde nadiren de olsa tahin helvalarında *Salmonella* spp.'ye rastlanılmaktadır. Tahin helvası üretiminde yüksek sıcaklıkta kavurma işlemi vardır ve bu sıcaklıkta *Salmonella* spp.'nin canlı kalması mümkün değildir. Bu durumda bulaşmanın ısıl işlem sonrası olduğu açıktır. Özellikle ithal susamdan elde edilen tahinin, helvaya *Salmonella* bulaşmasının başlıca kaynağı olduğu belirlenmiştir.

Tavuk yumurtalıklarında *Salmonella* bulunabilir. Dolayısıyla dışkıda ve yumurta kabuğunda *Salmonella* olmasa dahi yumurtada bu bakteri bulunabilir. Bu bulaşma 7.000'de 1 (bazı kaynaklara göre 20.000'de 1) gibi çok düşük olarak tahmin ediliyor ise de her gün milyonlarca yumurtanın tüketilmesi, bu şekilde kontamine olmuş yumurtaların halk sağlığındaki önemini göstermektedir.

Serolojisi

Salmonella spp.'de somatik (O) antijeni, hareketli olanlarda flagellar (H) antijeni ile bunların dışında bazı serotiplerde (Vi) antijenleri bulunur.

O antijenleri, hücre yüzeyinde bulunan yapısal kısımlardır. Genelde somatik antijenler, lipopolisakkarit ve protein komplekslerinden oluşurlar. *Salmonella* spp.'de hücre duvarı 0,2 μm'den kalın olmayan bir tabaka ile kaplanmıştır. Mikrokapsül adı verilen bu tabaka, hücre duvarının dışa doğru uzantısıdır.

Hücre duvarından başlayarak dışa doğru tabaka oluşturan polisakkaritler, somatik antijeninin karakterini belirler. Somatik antijenler, ısıya dayanıklıdır. Kaynama sıcaklığında yarım saat tutulduğunda özelliklerini yitirmez.

Flagellar antijenler, sadece hareketli kültürlerde bulunurlar. 100 ^{o}C'ta, seyreltik alkol veya asitle imha olurlar. Hareketli *Salmonella* serotiplerinin büyük çoğunluğu, faz 1 ve faz 2 olarak tanımlanan 2 farklı (H) antijeni içerir. Farklı serotipler bu antijenlerden sadece birini ya da ikisine de bulundurabilir. Serotiplerde bir fazdan diğerine geçiş görülebilir. (H) antijenleri, birbirlerinden ayrı yapı ve karakterde değişik bileşenlerden oluşmuşlardır. Bu faktörlerden bir kısmı *Salmonella* serotiplerine özgüldür ve sadece bir serovar veya benzer birkaç serovarda bulunur. Bunlar, karakteristik flagella antijeni olarak bilinir.

Her ne kadar *Salmonella* spp.'de kapsül olmasa da Vi antijenleri, kapsül antijeni olarak tanımlanır. Bunlar, somatik antijenlerinin en dışında, onu çevreleyen bir antijendir. Bütün *Salmonella* serotiplerinde bulunmaz. S. Typhi, S. Paratyphi C ve S. Dublin, Vi antijeni taşıyan serotiplerdir. Vi, virulans kelimesinden gelmektedir. Ancak Vi antijenine sahip olanlar ile olmayanlar arasında virulanslık bakımından fark olmadığı gösterilmiştir.

Enterobacteriaceae üyelerinde Vi antijeni yaygın bir şekilde görülmekle beraber bunlara *Salmonella* cinsi bakterilerde az rastlanır.

Salmonella serotiplerinde O, H faz 1 ve H faz 2 tanımlandıktan sonra, antijenik formül, Kauffmann-White şemasına göre yazılır. Buna göre önce O antijen(ler)i, ardından varsa Vi antijeni sonra H antijen(ler)i yazılır. Bu şemaya göre, örneğin *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:1,2 şeklinde formülize edilir. Bu serotip, O antijenleri olarak 1,4,[5] ve12, faz 1 H antijeni olarak i ve faz 2 H antijenleri olarak 1 ve 2 taşımaktadır.

Salmonella analizi 14.10. bölümde verilmiştir.

09.12. *Clostridium botulinum*

Her şeyden önce, kimi mikrobiyoloji kitaplarında görüldüğü ve gıda mikrobiyolojisi derslerinde anlatıldığı gibi bombaj yapmış sebze konservelerinde bombaja neden olan tek bakterinin *Cl. botulinum* olduğu bilgisi tümüyle gerçek dışıdır. *Clostridium* cinsine giren türlerin çoğu, sebze konservelerinde canlı kalırlarsa bombaja neden olurlar. Bir diğer deyiş ile bombajın tek nedeni *Cl. botulinum* değildir.

Tanımı

Diğer mikroorganizmalardan farklı olarak *Cl. botulinum*, tek bir bakteri türü değildir. Botulinum nörotoksini (botulin) olarak adlandırılan karakteristik proteini üreten tüm bakteriler *Cl. botulinum* olarak tanımlanır. Bunlar, önceden *Bacillaceae* familyası içinde sınıflandırılırken yeni taksonomik çalışmalar sonunda *Clostridia* sınıfı, *Clostridiales* takımı, *Clostridiaceae* familyası altına alınmıştır. Gram pozitif, çubuk şeklinde, sporlu, anaerop bakterilerdir. Sporları, terminal ya da subterminal formda bulunur.

Protein yapısında olan botulin, bugün için bilinen en kuvvetli biyolojik toksinler arasındadır. Bu toksinin yapmış olduğu botulizm, kayıtlara geçmiş en eski hastalıklardan birisidir. Bizans İmparatoru Leo VI (886-912), botulizm olarak tanımlanmış olmasa da kan sosislerinin, o tarihte üretimini ve tüketimini yasaklamıştır. Kan sosisi, kesilen havyanın kanından yapılan bir çeşit sosistir. Tıbbi kayıtlara 18. yüzyıl sonunda geçmiştir. 1793 yılında Güney Almanya'da kan sosisinden 13 kişinin hastalanması ve 6'sının ölmesi üzerine dikkatler kan sosisi üzerinde yoğunlaşmış, Almanya'da 1817-1822 yılları arasında 230 vaka belirlenmiştir. Daha sonra 1895 yılında Belçika'da 34 kişinin hastalanması sonrasında, Ghent Üniversitesi bakteriyoloji profesörü Emile Pierre van Ermengem tarafından etmen saptanmıştır.

Yaptığı hastalıklar, gıda kaynaklı botulizm, bebek botulizmi ve yara botulizmi olmak üzere üç şekilde görülebilir. Yara botulizmi, çok sıklıkla uyuşturucu kullananlarda enjeksiyon bölgesinde ya da kokain kullananlarda burun ve sinüslerde görülmektedir. Nadiren, ellerinde yara olan çiftçilerde de hasat

sırasında *Cl. botulinum* sporlarının bulaşması sonucunda görülebilir. Kırsal kesimde geleneksel olarak yaraya bal sürülerek balın doğal antiseptik özelliğinden yararlanılır. Bal, doğal olarak *Cl. botulinum* sporlarını bulundurabilir ve bu nedenle yara botulizmine neden olabilir. Çin Halk Cumhuriyeti'nde bu tehlikeye karşı balda ışınlama uygulanmaktadır.

Bunların dışında botulinin sabotaj ya da biyolojik silah olarak da kullanılabilme potansiyeli vardır. Havaya aerosol olarak salınan 1 g kristal toksinin 1-1,5 milyon kişiyi öldürmeye yeterli olduğu bildirilmektedir. Soluma ile alınacak toksinin öldürücü dozunun 0,7-0,9 ng olduğu tahmin edilmektedir.

Su kaynakları, sabotaja karşı açık olmakla birlikte, suların dezenfeksiyonu için kullanılan klor, toksini kolaylıkla parçalar.

Botulin, bugün için bilinen en tehlikeli doğal toksinlerden birisi olmakla beraber bazı kas hastalıklarının tedavisinde çok seyreltik A tipi botulin (botox) kullanılmaktadır. Özellikle aşırı kas kasılması nedeni ile göz kapaklarının açılmaması, çeşitli kramplar ve diğer kas kasılmaları, tik, diş sıkmak gibi hastalıkların tedavisinde kullanılması üzerinde çalışılmakta ve oldukça tatmin edici sonuçlar alınmaktadır. Yüz kaslarında zayıflama sağlayarak kırışıklıkların önlenmesi amacıyla botox uygulanması, FDA tarafından güvensiz olarak uyarılmakta ve ABD'de sadece 65 yaş altı insanlarda uygulanmasına izin verilmektedir.

Nörotoksinleri

Cl. botulinum tarafından üretilen nörotoksinler, serolojik olarak A'dan H'ye kadar olmak üzere 8 alt gruba ayrılır. H alt grubu olarak yeni tanımlanan sekizinci grupta, muhtemelen birden fazla toksin vardır. Bu 8 nörotoksini üreten bakteriler, birbirlerinden fizyolojik olarak ayrılabilen, DNA homolojisi ve 16S ile 23S gen sekans analizleri ile kendi içlerinde yüksek düzeyde ilişkide, ancak diğer gruplar ile uzak ilişki içinde olan ve I, II, III, IV olarak adlandırılan 4 gruba ayrılır (Çizelge 09.01). Bu dört grupta 30'dan fazla alt tip vardır.

Çizelge 09.01. Botulin tipleri

Özellik	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Nörotoksin tipi	A, B, F, H	B, E, F	C, D	G
Minimum gelişme sıcaklığı (°C)	12	3	15	?
Optimum gelişme sıcaklığı (°C)	37	30	40	37
Minimum gelişme pH'sı	4,6	5,0	?	?
NaCl inhibisyonu (%)	10	5	?	?
Minimum A_s	0,94	0,97	?	?
D_{100} (spor)	25	<0,1	0,1-0,9	0,8-1,2
D_{121} (spor)	0,1-0,21	<0,001	?	?

Bunlardan I. grupta A, B, F ve H tipi nörotoksin oluşturan bakteriler vardır. Tümü proteolitik karakter gösterir ve bazı karbohidratları fermente ederler. Minimum 12 ^oC ve optimum 37 ^oC'ta gelişirler. Gelişmeleri için gereken minimum pH 4,6 ve minimum su aktivitesi A_s 0,94'tür. %10 NaCl derişimi gelişmesini baskılar. Sporlarının indirgenmesi için 121 ^oC'ta D değeri 0,21 dk'dır. Buna göre, 121 ^oC'ta 3 dk ısıl işlem uygulaması, 14 D indirgeme sağladığı için botulin pişirmesi olarak tanımlanır. Bu grupta yer alan bakteriler toprak kaynaklıdır ve buna bağlı olarak genellikle etler, sebzeler, sebze konserveleri ve balda görülür.

II. grupta yer alanlar, proteolitik olmayan B, E ve F tipi nörotoksin oluşturanlardır. Bunlar, proteinleri enerji kaynağı olarak kullanamazlar, ancak yüksek düzeyde sakkarolitik[20] karakter gösterirler. Grup I'e kıyasla daha fazla karbohidratı fermente ederler. Psikrotrofik olarak tanımlanırlar. Minimum gelişme sıcaklıkları 3 ^oC olup, optimum 30 ^oC'ta gelişirler. pH 5,0 altında gelişemezler ve gelişmelerinin baskılanması için %5 NaCl derişimi yeterlidir. Gelişmeleri için gereken minimum su aktivitesi 0,97'dir. Sporlarının indirgenmesi için 82,2 C'taki D değeri, lizozim uygulaması olup olmamasına göre çok değişkendir. Bu değer lizozim uygulandığında 231 dk iken lizozim uygulanmazsa sadece 2,4 dk'dır. Bunlar, tripsin ile aktive edilmezlerse hastalığın oluşması için yeterli toksisiteye sahip değillerdir. Bu grupta yer alan bakteriler deniz ve göl kaynaklıdır ve bunlara genellikle etler, balıklar ve minimal işlenmiş gıdalarda rastlanır.

Çizelgeden de görüldüğü gibi Grup I'e giren suşlar, Grup II suşlarından daha yüksek NaCl direnci, daha düşük pH ve daha düşük su aktivitesi değerlerinde gelişebilmeleri ve sporlarının ısıl işleme çok daha yüksek direnci ile ayrılırlar. Grup II suşları ise daha düşük minimum gelişme sıcaklığı ile optimum gelişme sıcaklığında hem daha düşük hem de daha geniş bir sınırda gelişebilme özellikleri ile Grup I'e üstünlük sağlamaktadır.

Cl. botulinum Grup I ve II, insan botulizminden sorumlu başlıca gruplarken *Cl. botulinum* Grup III, insanlarda hastalık yapmaz, ancak çeşitli hayvan türlerinde botulizmden sorumludur. *Cl. botulinum* Grup IV ise insan veya hayvanlarda botulizm ile ilişkili görülmemektedir. Dolayısıyla, Grup III ve özellikle Grup IV, gıda mikrobiyolojisini ilgilendirmez.

Grup IV'te yer alan ve G tipi nörotoksin üreten suş, 1960'lı yıllarda Arjantin'de topraktan izole edilmiştir. Her ne kadar botulin oluştursa da oluşturulan botulinin, bu tarihe kadar insan ve hayvanlarda hastalık yaptığı belirlenmediği için G tipi botulin oluşturan suşlar, *Cl. botulinum* grubundan çıkarılmış ve *Cl. argentinense* türü olarak tanımlanmıştır.

E tipine daha ziyade okyanus ve göllerde rastlanır. Buna bağlı olarak, E tipi toksin, balık ve diğer su ürünlerinde görülür.

[20] Enerji sağlamak için karbohidratları kullanan mikroorganizmalar

Botulinum nörotoksinleri, ağır zincir (100 kDa) ve hafif zincir (50 kDa) içeren 150 kDa proteinlerdir. Ağır zincirlerin iki işlevsel alanı vardır. C-terminal bölgesi sinir hücresine nörotoksin bağlamada rol alırken N-terminal bölgesi hafif zincirin sinir hücresinin sitoplazmasına hareketinde görev yapmaktadır.

Enterotoksinleri suda çözünebilen, asitlere dirençli, yüksek moleküllü proteinlerdir. A tipi toksinin toksisitesinin B tipi toksinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Nörotoksik protein 150 kDa büyüklükte tek bir polipeptit zincirden oluşur. Bu polipeptit yapı proteolitik olan A, B, F tiplerinde endojen proteazlar aracılığıyla, proteolitik olmayan B, E, F tiplerinde ise ekzojen proteazlar yardımıyla iki zincire parçalanır ve buna bağlı olarak toksisite artar. Toksin, organizmanın logaritmik gelişme evresinde sentezlenip hücre içinde birikir ve logaritmik gelişme döneminin sonunda ortama salınır.

Botulinum nörotoksinleri, boyutları 300 kDa ile 900 kDa arasında değişen yardımcı proteinlere sahip kompleksler oluşturur [örneğin, hemaglutinin (HA) ve toksik olmayan hemaglutinin (NTNH)]. Bu yardımcı proteinler, nörotoksini korur ve vücuda emilimini kolaylaştırır.

Cl. botulinum suşunun ilk genomu 2007 yılında yayınlanmıştır (Grup I suşu ATCC 3502). Günümüzde genel kullanıma açık olan veritabanlarında birçok *Cl. botulinum* genomunun sekansı mevcuttur. Genom sekanslama maliyeti son yıllarda büyük miktarda düşüş göstermiştir. Buna karşın botulin oluşturan suşların biyoterorizm endişesi ile başka laboratuvarlara gönderilmesindeki kısıtlamalar, konu üzerindeki genetik analizleri de kısıtlamaktadır.

Ekolojisi

Grup I, toprak kökenli ve sporlu bir bakteri olması nedeni ile toprağa yakın olarak yetiştirilen sebzelerde ve tozda (havada) doğal olarak spor formunda bulunur. Grup II, tatlı ve tuzlu sularda (okyanuslar ve göller) görülür. Spor formunda iken rüzgârla her yere taşınabilir.

Gelişmesi ve Canlı Kalması

Cl. perfringens gibi aerotolerant anaerop değil, obligat (zorunlu) anaeroptur. Buna bağlı olarak, gelişmesi için anaerop koşulların sağlanmış olması gerekir. Bu gereksinmeye gıda mikrobiyolojisi açısından bakıldığında kapalı ortamda oksijen bulunmaması gerekir.

Sebze konserveleri üretiminde, tepe boşluğunda hava çıkarma işlemi sırasında mevcut hava, su buharı ile yer değiştirir ve *Cl. botulinum* gelişmesi için yeterince oksijensiz bir ortam sağlanmış olur. Ayrıca kapalı bir ortamda önce aerop bakterilerin gelişerek oksijeni bitirmeleri de *Cl. botulinum* gelişmesi için ortam sağlayabilir. Gelişme koşulları, farklı nörotoksin oluşturan gruplara göre önemli ölçüde değişiklik gösterir.

Mezofilik bir mikroorganizmadır, ancak tiplere göre sıcaklık istekleri değişir. Tip A ve B için gelişme sıcaklıkları optimum 37 ºC, minimum 10-12,5 ºC ve maksimum 47,5-50 ºC'tır.

E tipi optimum olarak 30 ºC'ta gelişir. F tipi psikrotrof olup buzdolabı sıcaklığında bile uzun sürede toksin oluşturabilir. *Cl. botulinum*, optimum olarak pH 6,0-7,5 arasında gelişir. pH 4,5 altında gelişemez. Sporlarının çimlenmesi için minimum sıcaklık ve pH istekleri, bakterinin gelişebilmesi için gerekli minimum değerlerden biraz daha yüksektir. Sporların çimlenebilmesi için en düşük sıcaklık 15 ºC ve en düşük pH 5,0-5,1 olarak belirlenmiştir. Genel olarak pH'nın spor çimlenmesi ve gelişme için optimum oluşu toksin oluşumunu destekler. Toksin oluşumunda minimum su aktivitesi değerleri A ve B tipleri için A_s 0,94, E tipi için A_s 0,97'dir. Sıcaklığa dirençleri A ve B tipleri için D_{121} 0,21 dk, F tipi için D_{121} 0,17 dk olarak belirlenmiştir. %10 oranında tuz ile %60 oranında sakkaroz bulunan ortamlarda toksin oluşturamaz. Tuzun daha düşük konsantrasyonları (%3,0-3,5) eğer beraberinde koruyucu teknolojik bir işlem (tütsüleme, ısıl işlem uygulaması) varsa toksin oluşumunu engeller. Gıdalara katılan nitratlar da gelişmeyi ve toksin oluşumunu engeller.

Proteolitik suşların gelişme ve toksin üretimi için optimum sıcaklık 35 °C, proteolitik olmayanlar için 26-28 °C'tır. Proteolitik olmayan B, E ve F tipleri düşük sıcaklıklarda (3-4 °C) toksin üretebilir.

A tipi toksin yapanlar ile B ve F tipi toksin yapanların bir kısmı proteolitik özelliktedir. Proteolitik aktivite göstermeyen grupta E tipinin tüm suşları ile B ve F tipi toksin yapanların proteolitik olmayanları yer alır. C ve D tipi *Cl. botulinum* suşları da proteolitik değildir, her iki tip de ortak metabolik sisteme sahip olduğundan ayrı bir grupta toplanmıştır. Proteolitik suşlardaki endojen proteazlar veya refakatçi flora olarak bulunan proteolitik suşların proteazları, *Cl. botulinum* toksininin aktivitesini artırmada rol oynar.

Patojenitesi

İlk kez 1800'lü yılların sonunda belirlendikten sonra *Cl. botulinum*, zaman içinde gıda mikrobiyolojisinin en önemli patojen bakterilerinden birisi olmuştur. Neden olduğu botulizm, diğer patojenlerin neden olduğu hastalıklara oranla oldukça nadir görülmekle beraber ölüm oranı diğer patojenler ile kıyaslanamayacak kadar yüksektir. Önceleri, düşük asitli olarak tanımlanan gıdaların ısıl işlem ile korunmasında temel olarak *Cl. botulinum* sporlarının imhası esas alınmakta ve buna uygun olacak şekilde ısıl işlem uygulanmakta idi. Buna göre, 121 ºC'ta 3 dk'lık ısıl işlem ile 14 D indirgeme sağlanmaktadır ve bu indirgeme *Cl. botulinum* için tümüyle yeterlidir. Günümüzde düşük asitli gıdalarda 1 kg bezelye konservesinin sterilizasyonu esas alınır ve uygulanan ısıl işlem normu 121 ºC'ta 15 dk'dır. Bu şekilde *Cl. botulinum* için 15/ 0,21= 71 D'lik indirgeme sağlanır. Kuşkusuz bu ısıl işlem normu *Cl. botulinum* için değil, *Geobacillus stearothermophilus* gibi ısıya çok daha dirençli olan saprofitlerin ürünü bozarak ekonomik kayıplara neden olmasını önlemek içindir.

Cl. botulinum tarafından oluşturulan hastalık, fark edilemeyecek kadar yumuşak geçebileceği gibi 24 saat içinde ölüme de neden olabilir. Genel olarak nörotoksin içeren gıdanın tüketiminden 12-36 saat sonra semptomlar görülmekle beraber semptomların birkaç saat içinde görülmesi ya da 14 saat içinde görülmemesi de mümkündür. Genellikle ilk semptom mide bulantısı ve kusma olup bunu takiben görme bozuklukları (çift görme, net görememe, genişlemiş göz bebeği), ağız ve gırtlak fonksiyonlarında kayıp (konuşma ve yutkunmada zorluk, ağız, boğaz ve dilde kuruma), genel bitkinlik ve kas koordinasyon kaybı ile solunumda zayıflama görülür.

Karın ağrısı, ishal ya da kabızlık şeklinde diğer gastrointestinal semptomlar da görülebilir. Mide bulantısı ve kusma A tipine kıyasla B ve E tipi toksinlerde daha fazla yaygın iken yutkunma güçlüğü ve kas zayıflamaları tip E'ye göre A ve B tiplerinde daha yaygındır. Ağız, dil ve gırtlakta kuruma ise B tipi vakalarda daha yaygındır. Solunum yetersizliği ve solunum yolları tıkanması botulizmden kaynaklanan ölümlerin başlıca nedenidir. Bu nedenle ölüm oranı 20. yüzyılın ilk yarısında yaklaşık %50 (bazı kaynaklara göre 1910-1919 yılları arası %70) iken antiserum ve solunum destek sistemlerindeki gelişmelere bağlı olarak bu oran yaklaşık %10'a (bazı kaynaklara göre 1980'li yıllarda %9'a ve 1993'de %2'ye) kadar düşmüştür. Botulizm, karbon monoksit zehirlenmesi ve özellikle *Campylobacter jejuni* tarafından oluşturulan Guillain-Barré sendromu ile karıştırılabilmektedir.

0,1-1 µg toksinin öldürücü olduğu bilinmektedir. Buna göre LD_{50} değeri 0,001 µg/kg (1 ng/kg) olarak verilmektedir. Botulinin öldürücü dozunun belirlenmesi, 2. Dünya Savaşı'nda esirler üzerinde denenerek yapılmıştır.

Gıda ile alınan toksin, ince bağırsağa ulaştıktan sonra burada absorbe olur ve lenf sistemi ile kana karışır. Ardından, sinir sistemine ulaşan toksin, burada belirli noktalara bağlanarak sinirlerin komuta ettiği kaslara komutların gönderilmesini engeller ve böylece kasların paraliz (felç) olmasına neden olur. Nörotoksik etkili proteinin, sinir düğüm ve kavşaklarında uyarı mesajlarının iletilmesini bloke ettiği, bunun sonucu olarak da sinir uçlarında asetilkolinin serbest hale geçmesinin engellendiği bilinmektedir.

Botulizmin klinik tanısı en etkin olarak hastanın kan, dışkı ya da kusmuğunda botulinal toksin belirlenmesi ile yapılır.

1899-1990 yılları arasını kapsayan 90 yıllık dönemde ABD'de belirlenen 2320 vakanın 1036'sı (%44,7) ölüm ile sonuçlanmıştır. Bunların 384'ü A, 106'sı B, 105'i E ve 3'ü F tipidir. 2 vakada ise A ve B tipleri beraberce görülmüştür. Başka kaynaklara göre, gelişmiş ülkelerde ölüm/ vaka oranı %5-10 kadardır. Dünya genelinde 1995 yılı kayıtlarına göre botulin kaynaklı hastalıklarda %52 oranında B tipi toksin sorumlu iken A tipi toksinin %34 ve E tipi toksinin %12 oranında sorumlu olduğu, F tipi toksinin ise oldukça nadir olduğu kayıtlara geçmiştir.

İntoksikasyona Aracı Olan Gıdalar

Botulizme neden olan gıdaların başında yeterli ısıl işlem görmeden yapılan ve tüketim öncesi pişirilmeden yenilen sebze konserveleri gelir. Salata olarak kullanılan ev yapımı bezelye konservesi tipik bir örnektir. Yine evlerde tuz sirke karışımına yatırılarak ve baharatla çeşnilendirilerek hazırlanan sebzeler, çiğ jambon, tütsülenmiş veya fermantasyon yolu ile lezzetlendirilmiş balıklar, buharla az pişirilen balıklar, salamura et ürünleri, ciğer ezmesi, çeşitli salata sosları, vb. yiyecekler botulizme aracı olan gıdalardır. Özellikle uzak doğu ve İskandinav ülkelerinde aracı gıda olarak balık önemli görülmektedir. Botulizmde ABD'de ev tipi konserveler, Avrupa'da ise et ürünleri öne çıkmaktadır.

Bir gıdada, canlı *Cl. botulinum* bulunması, o gıdanın, mutlaka botulin içerdiği anlamına gelmez. Bakteri gelişemez ise toksin üretimi de olmaz.

Çoğu gıda, *Cl. botulinum* için yeterli besin içerse de bunların tümü, gelişme için gerekli olan anaerobik koşulları sağlamaz. Hem besin içeriği hem de anaerobik koşullar, pek çok konserve gıdada ve et ürününde sağlanır. Gıdada asitlik yüksek ve/veya nem düşük ve/veya tuz yüksek ise *Cl. botulinum* gelişmesi olmaz. Gıda 3 ^{o}C altında tutulmadıkça soğutma, proteolitik olmayan suşlar için toksin oluşumunu engellemez. Sadece bozulmayı önlemek için işlenmiş, ancak soğutulmamış gıdalara botulizm vakalarında sıklıkla rastlanır.

Gıda kaynaklı botulizmin ticari sonuçları çok ağır olabilmektedir. Örneğin 2013'te Yeni Zelanda'da bir süt ürünü, *Cl. botulinum* ile kontaminasyon şüphesiyle piyasadan çekilmiş ve yüz milyonlarca dolar zarara yol açmıştır. Konserve veya şişelenmiş gıdalarda botulinum pişirmesinin (121 ^{o}C'ta 3 dk) etkin şekilde uygulama yetersizliği, *Cl. botulinum* Grup I ile ilişkili birçok gıda kaynaklı botulizm vakasına neden olmuştur. 2006 yılında Tayland'da meydana gelen geniş çaplı bir hastalanma (209 vaka), evde uygun olmayan şartlarda konserve edilen bambu filizlerinin tüketimi ile ilişkili bulunmuştur. 2007 yılında ABD'de ticari bir sosun yetersiz ısıl işlemi sonucu 8 botulizm vakasına yol açtığı belirlenmiş ve önemli miktarda ürünün piyasadan çekilmesine neden olmuştur. Soğutulmuş olarak saklanması gereken gıdaların soğuk zincir kırılmaları da pek çok gıda kaynaklı botulizm vakasından sorumlu bulunmuştur. Ticari soğutulmuş havuç suyu ve ticari tavuk böreği ile ilişkili hastalanmalar bu konudaki tipik örneklerdir.

Grup II B tipi nörotoksini oluşturan *Cl. botulinum* suşları, sıklıkla Avrupa'da et ürünleri ile bazen de Kuzey Amerika'daki balık ürünleriyle ilişkili bulunmaktadır. Son yıllarda İzlanda'da (en az biri domuz sosisiyle ilişkili), Fransa'da (evde hazırlanan jambon) görülen gıda kaynaklı botulizm vakaları da *Cl. botulinum* Grup II tip B ile ilişkili bulunmuştur. *Cl. botulinum* Grup II tip E'yi içeren botulizm vakaları çoğunlukla Kanada ve Alaska'nın kuzeyinde su ürünleri (örneğin vakumlanmış, tütsülenmiş, tuzlanmış, kurutulmuş) ve evde hazırlanan gıdalarla ilişkilidir. 2009 yılında Fransa'da ortaya çıkan botulizm vakasında (3 vaka) ticari olarak vakumlanmış füme alabalığın tüketimi ile ilişkili bulunmuş ve bunun

muhtemelen ürünün 3 °C üzerinde tutulması ya da soğuk zincirde uzun süreli kırılmalar sonucunda *Cl. botulinum* Grup II tip E'nin gelişerek nörotoksin oluşturması sonucu meydana geldiği belirlenmiştir. Minimal ısıtılan ya da soğutulan gıdalar da günümüzde endişe verici durumlara yol açabilmektedir.

Özellikle ABD'de hapishanelerdeki mahkûmların kaçak olarak şekerli ve nişastalı yemek artıklarını doğal fermantasyona bırakarak düşük alkollü, ancak çok düşük kalitede şarap yaptıkları bilinmektedir. İnfaz memurları (gardiyanlar) bu uygulamayı görmezden gelmektedirler. Bu doğal fermantasyon sırasında *Cl. botulinum* da gelişmekte ve öldürücü dozlara çıkmasa da mahkûmlarda hastalanmalara neden olmaktadır. Vakaların artması üzerine hapishanelerde daha etkin önlemler alındığı bildirilmiştir.

Bebek Botulizmi

Arılar, çiçeklere rüzgâr ve tozlarla doğal olarak bulaşan *Cl. botulinum* sporlarını kovana taşırlar. Bu sporlar da doğal olarak bala geçerler. Bu, tümüyle doğal bir kontaminasyon olup tarımsal üretim/ gıda teknolojisi hijyen eksikliği değildir.

Cl. botulinum spor varlığının ballarda gösterilmesi tüm gıdalar içerisinde üstünde en fazla durulan konudur. Süt emmekte olan bebeklerde spontan olarak ortaya çıkan bebek botulizmlerine *Cl. botulinum* sporları neden olur.

Sporların germinasyonu ile bağırsakta gelişen *Cl. botulinum* vejetatif hücreleri, toksin oluşturarak bebek botulizmine yol açar. 6 hafta-1 yaş grubunda, ancak ağırlıklı olarak 2-3 aylık bebeklerde görülen bu botulizm türü ilk kez 1976 yılında belirlenmiştir.

Asıl olarak A ve B tipi ve nadiren diğer tiplerin yol açtığı bebek botulizmi Afrika dışındaki diğer kıtalarda görülmüştür.

Bebek botulizmi çok geniş bir aralıkta seyreder. Bazı bebekler sadece hafif bir güçsüzlük, uyuşukluk, azalan süt emme davranışı gösterirken çoğu daha ciddi olarak süt emmede ve yutkunmada zorluk, sürekli ağlama, genel kas zayıflamasına bağlı olarak başını kaldıramama gibi semptomlar gösterirler. Hastanelik olan bazı vakalarda solunum durması görülmekle birlikte, etkin bir solunum desteği ile çoğunun kurtarıldığı bildirilmiştir. Bebek botulizminde ölüm/ vaka oranı %2 olarak bildirilmektedir.

Dünyadaki bebek botulizmlerinin %90 kadarına ABD'de rastlanmaktadır. ABD'deki bebek botulizmi sıklığı 100 bin bebekte 2 olarak verilmektedir.

Bal, bebek botulizminin bilinen kaynaklarından birisidir. ABD'de yapılan araştırmalar balların %13 kadarında *Cl. botulinum* sporu olduğunu göstermiştir. Buna bağlı olarak FDA, CDC ve Amerikan Pediatri Akademisi, 1 yaş altındaki bebeklere bal verilmemesini önermektedir.

1 yaş üzeri insanlarda bağırsaklar yeteri kadar geliştiği için bebek botulizmi olarak bilinen hastalık çok nadir olarak görülür.

Yapılan araştırmalar ballarda 1-10 spor/kg düzeyinde *Cl. botulinum* sporu olduğunu göstermekte, ancak bebeklerde botulizme neden olan ballarda bu sayının 10^4/kg olduğunu belirtmektedir.

Balda *Cl. botulinum* sporlarına rastlansa da bunların çimlenerek botulin oluşturması söz konusu değildir. Benzer şekilde vejetatif formda *Cl. botulinum* bala bulaşırsa bunlar da gelişerek toksin oluşturamazlar. Dolayısıyla balda botulin analizi yapılmasına gerek yoktur. Sadece, sabotajdan endişe ediliyorsa balda botulin analizi anlamlı olabilir.

Mısır şurubu ve pirinç içeren bebek mamalarında da *Cl. botulinum*'a rastlanmakla beraber bunlardaki *Cl. botulinum* sayısı baldaki sayıya göre çok daha düşük olduğu için bu tip gıdalara balda olduğu gibi potansiyel tehlike olarak bakılmamaktadır.

Cl. botulinum sporlarının havadaki toz ile solunup, tükürükle karışarak mideye ve bağırsaklara ulaştığında burada çimlenip geliştikten sonra özellikle bebeklerde zehirlenmelere yol açabildiği de belirtilmektedir.

Toksin Testleri

A, B, E ve F tipi botulin oluşturan bakteriler ve toksinlerinin belirlenmesi için hızlı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Kültür ortamında üretilen toksinler DIG-ELISA ve amp-ELISA gibi ELISA teknikleri kullanılarak belirlenebilmektedir. Analiz, toksin antijenini belirlediği için biyolojik aktif olan ya da olmayan toksinler bu yöntemlerle belirlenebilmektedir.

ELISA testlerinin analizi 1 gün gerektirir. Canlı organizmaların toksin geni, vejetatif hücre ya da sporun 1 gecelik inkübasyonundan sonra PCR tekniği kullanılarak 1 gün içinde analiz edilebilmektedir.

Cl. botulinum analizi, standart bir mikrobiyolojik kalite kontrol laboratuvarında yapılmamalıdır. Gelişmiş ülkelerde bu bakterinin analizinin yapılabilmesi için özel güvenlik önlemlerinin alındığının belgelendirilmesi gereklidir. Bu kısıtlamanın nedeni gıdaların *Cl. botulinum* analizinde pozitif sonuç alınırsa laboratuvarda botulin içeren bir gıdanın içerdiği toksine oranla binlerce kat daha fazla miktarda toksin olmasıdır.

Bu analizin yapıldığı laboratuvarlarda en azından belirli antitoksinlerin sürekli ve taze olarak bulundurulmalı ve nasıl kullanıldığı tatbikat yapılarak personele öğretilmiş olmalıdır. Acil olarak kullanılması gereken portatif solunum destek cihazlarının el altında ve işler halde tutulmalı ve personele nasıl kullanılacağı öğretilmelidir. Analiz sonrası kullanılan besiyerlerinin ve çalışma ortamının sterilizasyonu/ dezenfeksiyonu, laboratuvar kapısına botulin ile çalışıldığını uyaran levhalar asılması, tercihen bağımsız bir laboratuvarda ya da laboratuvarda özel bir bölmede bu analizlerin yapılması, hafta sonları ve/veya çalışma saatleri dışında yalnız çalışılmaması gibi ayrıntılar sadece doğru

laboratuvar uygulama (GLP good laboratory practice[21]) kurallarının sağlanması değil bunun ötesinde özel olarak yasal denetlemeleri de gerektirmektedir.

Bir gıdada canlı *Cl. botulinum*'a rastlanılmış olması o gıdanın botulizm açısından mutlak tehlikeli olacağını göstermez. Zehirlenme için bakterinin gelişmesi ve toksin oluşturması gerekir. Bu nedenle gıdanın botulizm açısından gerçek kontrolü canlı hücre aranması/ sayılması yerine toksin varlığının belirlenmesi şeklinde olmaktadır. Bu analiz, izolata uygulanabileceği gibi gıda maddesinde önceden oluşmuş toksin olduğu tahmin ediliyor ise izolasyon aşaması atlanarak doğrudan gıda maddesine de uygulanabilmektedir.

Fare Testleri

Basit olarak izolat ya da doğrudan şüpheli gıdanın farelere intraperitonal (karın zarı içine) olarak enjekte edilmesi ve farelerde botulizm semptomlarının izlenmesidir. İzolat ile yapılan denemede tripsin uygulanmış ve uygulanmamış kültürler kullanılır. Gıdada analizi yapılacaksa homojenizasyondan sonra gıda santrifüjlenir ve ardından süpernatant, gerekirse filtreden geçirilerek kaba parçacıklardan tümüyle arındırılır. Kültürde olduğu gibi tripsin uygulanmış ve uygulanmamış gıda kullanılır.

-Tripsin uygulanmış ve uygulanmamış örnekler jel fosfat tampon ile 1:5; 1:10 ve 1:100 oranında seyreltilir. Seyreltme yapılmamış numune de dâhil olmak üzere 4 numune, 0,5'er mL intraperitonal olarak farelere ayrı ayrı steril şırınga ile verilir. Her grupta 20-25 g ağırlığında 2 fare kullanılır.

-Tripsin uygulanmamış numuneden 1,5 mL alınıp 100 ^{o}C'ta 10 dk ısıtılır ve buradan yine 0,5 mL alınarak aynı şekilde fareye aşılanır. Bir anlamda kontrol olan bu fare, deneme sonunda canlı kalmalıdır.

-48 saat süresince farelerde botulizm belirtileri izlenerek belirtiler ve ölümler kaydedilir. Botulizmin tipik belirtileri ilk 24 saatte fare derisinin buruşmasıyla başlar. Solunum güçlüğü, kol ve bacaklarda güçsüzlük, felç ve son olarak solunum yetersizliği ve ölüm gerçekleşir. Botulizmin klinik belirtileri olmadan ölen fareler, enjekte edilen numunenin botulin toksini içerdiğini göstermeye yeterli değildir. Nadiren ölüm, enjekte edilen sıvıdaki diğer kimyasallardan da meydana gelebilir.

-Analiz edilen kültürde/ gıdada botulin toksinin varlığı belirlenirse bu kez A, B, E ve F monovalent antitoksinleri kullanılarak hangi tip toksin olduğu saptanır. Bu amaçla antitoksinler, farelere toksinli numune enjeksiyonundan 30-60 dk önce aynı şekilde intraperitonal olarak enjekte edilir.

[21] Good Manufacturing Practice (GMP), Good Laboratory Practice (GLP) gibi uygulamalarda "Good" kelimesi Türkçede "iyi" değil "doğru" olarak kullanılmalıdır.

Kontrolü, Önlenmesi ve Tedavisi

Gıda teknolojisinin temel kurallarına göre üretilmiş endüstriyel et ve sebze ürünlerinde *Cl. botulinum* tehlikesi sıfıra yakındır. Günümüzde asıl tehlike, her türlü ev tipi üretim[22] olarak tanımlanan gıda üretimleridir. Bunların, Grup I ve Grup II *Cl. botulinum* suşlarından ve toksinlerinden tümüyle arındırılması dünya genelinde mümkün görülmemektedir.

Ev tipi sebze konservelerinde en tehlikeli olanlardan ilk sırada olan bezelye konservesidir. Fasulye, bamya vb. ev konserveciliği ürünlerini satın alan tüketici, bir şekilde bunları pişirir. Ancak ev tipi bezelye konservesinin doğrudan çeşitli salatalarda kullanılması söz konusudur. Benzer tehlike doğrudan salata olarak kullanılabilecek ev tipi haşlanmış mısır konservesi vb. gıdalar için de geçerlidir. Dünya genelinde ev tipi sebze konservelerinde gerçekten en az 121 °C'ta ve en az 3 dk ısıl işlem uygulandığı garanti edilemez. Oysa endüstriyel üretimlerde bu konuda çok genel olarak sorun yoktur. Ya da daha doğru bir tanımlama ile tümüyle ihmal edilecek boyuttadır.

Gıda güvenliği açısından temel yaklaşım tüm patojenlerde olduğu gibi botulin toksinini üreten tüm bakterilerin gıda teknolojisi tarafından basitçe açıklanmış ısıl işlem ya da başta sosisler olmak üzere et ürünlerinde kullanılan nitrit/ nitrat gibi koruyucularla indirgenmesidir.

Cl. botulinum toksinleri ısıya duyarlıdır. Kaynama derecesinde birkaç saniyede tahrip olurlar. 80 °C'ta 6 dk'da, 72 °C'ta 12 dk'da tamamen inaktif hale geçerler. Bu durum özellikle tekrar ısıtılarak yenen gıdalarda toksin riskini azaltmaktadır. Başka kaynaklara göre, 85°C üzerinde 5 dk ısıl işlem inaktivasyon için yeterlidir.

Şiddetli vakaların ölümcül olmadığı durumlarda tam iyileşme aylar hatta yıllar alabilir.

Cl. botulinum analizi 14.11. bölümde verilmiştir.

09.13. *Clostridium perfringens*

Tanımı

Clostridiaceae üyesi olan *Cl. perfringens* anaerobik, Gram pozitif, spor oluşturan, hareketsiz, çubuk şeklinde bir bakteridir. Mikroskop altında genellikle tek ve ikili zincir olarak görülürler, nadiren kısa zincir oluştururlar. Sporları subterminal veya terminal pozisyonda bulunur. Kapsül oluşturur ve jelatini parçalar. Birçok karbohidratı fermente etme yeteneğine sahiptir. Litmuslu sütte asit oluşturur, pıhtı yüksek oranda gaz oluşması ile dağılır ve gazlı fermantasyon (stormy fermentation) izlenir. *Cl. perfringens* suşları, gıdalarda

[22] Evde ya da yerel olarak üretim yapan ev konserveciliği işletmeleri ile küçük gıda işletmeleri ve yerel lokantalar

sülfit indirgeyen anaeropların çok büyük bölümünü oluşturur. Nitratı indirger. İlk kez William Henry Welch (1850-1934) tarafından tanımlanmıştır.

Cl. perfringens denildiğinde tip A anlaşılır. Gelişmiş ülkelerde halen gıda kaynaklı olarak en fazla hastalanmaya yol açan patojenlerden birisidir. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), ABD'de her yıl 1 milyon *Cl. perfringens* vakası olduğunu tahmin etmektedir.

Ekolojisi

Doğada insanların, evcil hayvanların ve yabani hayvanların bağırsaklarında bulunur. Sporları, toprakta canlılığını sürdürür. Bu nedenle, bazı bilimsel kaynaklarda "toprak ve dışkı kökenli" olduğu belirtilir, ancak gıdalarda bu bakteriye rastlanması fekal kontaminasyonun göstergesi olarak kabul edilir. İçme ve kullanma sularında bu amaçla *Cl. perfringens* analizi yapılır. *Bacillus* türlerinde olduğu gibi hafif bir ısıtma ile sporların çimlenmesi teşvik edilir.

Cl. perfringens doğada çok yaygındır. Toprak, toz, hava, su, lağım, insan ve hayvan dışkısı ve birçok gıda maddesinin üzerinde bulunur. Hijyenik koşullara dikkat etmeyen ve genellikle yemeklerini büyük topluluklar halinde yiyen kişilerin bağırsaklarında daha çok *Cl. perfringens* bulunur. İnsanların bağırsaklarında doğal olarak bulunan *Cl. perfringens* sayısı zehirlenmeye yol açacak kadar yüksek değildir.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve Kontrolü

Cl. perfringens, gelişebilmek için 13-14 aminoasit ve 5-6 vitamine gereksinim gösterir. Bu istekleri, zehirlenmelerin genellikle proteinli gıdalarda görülmesini bir ölçüde açıklar.

Cl. perfringens, anaerobik olmakla beraber aerotoleranttır. Bu nedenle gelişmesi için mutlak anaerobik koşullar gerekmez. Et ürünlerinin redoks potansiyeli bu bakterinin gelişmesi için uygundur. pH 5,5 ile 8,0 arasında kolaylıkla gelişir. pH 5,0 altında ve pH 8,0 üzerinde gelişme olmaz. Enterotoksin oluşumu için en uygun pH 6,5-7,3 olarak bildirilmiştir.

Gelişme sıcaklık aralığı 20-50 ^{o}C olmakla birlikte bu aralık kimi kaynaklarda 15-50 ^{o}C olarak verilmektedir. Optimum gelişme sıcaklığı laboratuvar koşullarında 37 ^{o}C ile 47 ^{o}C arası olarak saptanmıştır. Sporlanma ve toksin oluşumu için en uygun sıcaklık, insan vücut sıcaklığı olan 37 ^{o}C'tır. 0,995'in altındaki su aktivitelerinde gelişme hızı azalır. Gelişme için minimum A_s çözünen maddeye, sıcaklık derecesine, pH'ya ve diğer faktörlere bağlıdır. Yemek (tipik olarak et) pişirildiğinde/ ısıtıldığında oksijen uzaklaşır ve ortam anaerop hale geçer. Generasyon süresi 12 dk'ya kadar düşebilir. Bu nedenle 10^6 ya da daha yüksek sayıda bakteri vücuda girdiğinde bunlar, ince bağırsağa ulaşıncaya kadar sayılarını zehirlenmeye neden olacak düzeye çıkartırlar.

Sıcaklık derecesindeki ani düşmeler vejetatif hücreler üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. Gelişme dönemindeki hücrelerde çevre sıcaklığı 37 ^{o}C'tan 4 ^{o}C'a

düştüğünde %96'lık bir ölüm oranı saptanmıştır. 4 °C'ta 90 dk tutma sırasında %38'lik bir azalma daha olarak toplam ölüm oranı % 99,9'a ulaştığı gösterilmiştir. Donma sıcaklıkları hücrelere daha fazla olumsuz etki yapar. Bununla birlikte sporlar için soğutma ya da dondurmanın olumsuz etkisi yok denecek kadar azdır.

Etleri olgunlaştırmada kullanılan sodyum nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının çok üstündeki derişimlerde dahi gelişebilirler.

Cl. perfringens, doğada çok yaygındır ve bu nedenle gıdalara bulaşmasının tam olarak engellenmesi çok zordur. Buna rağmen sanitasyonun tam anlamıyla uygulanmasının ihmal edilmemesi gereklidir. Eğer bu konuda dikkatli davranılırsa kontaminasyon oranı asgariye indirilebilir. Kontaminasyon engellenirse bakterinin tehlike düzeyi olan 10^6-10^8 KOB/g'a ulaşması uzun sürer. Gıdada birkaç *Cl. perfringens* bulunması zehirlenmeye neden olmaz[23]. Bu nedenle sporların germinasyonu ve vejetatif hücrelerin çoğalması engellenirse tehlike kontrol altına alınabilir. En basit yöntem, gıdayı pişirmek ve uzun süre bekletmeden tüketime sunmaktır. Bu mümkün değil ise gıdayı küçük parçalara ayırarak soğukta saklamak gelişmeyi engeller. Gelişme için minimum sıcaklık 15 °C'tır. Çok dolu olmayan her buzdolabında, bu depolama sıcaklığı kolaylıkla sağlanır.

Sıcaklık 0 °C'a yaklaştıkça popülasyon azalmaya başlar, vejetatif hücreler bu derecelerde stabil değildir. *Cl. perfringens* vejetatif hücreleri, pişirme ile yok edilir. Ancak ısıya dayanıklı sporlar canlı kalır. Sporların öldürücü düzeyin altında ısıya tabi tutulması, germinasyonu teşvik eder. Sporların ısıya dayanıklılığı suştan suşa farklılık gösterir. Eğer ısıya dayanıklı sporlar varsa bunların yok edilmesi için gıdanın ısıtılması uzun süreceği için gıdada arzu edilmeyen organoleptik bozulmalar oluşur.

Pişirildikten sonra bekletilen gıdalar buzdolabında saklanmış olsalar dahi tüketilmeden önce mutlaka iyice ısıtılmalıdır. Etli yemekler servis öncesi 10-11 dk kaynatılmalıdır. Pişirilmiş yemek, sıcak tutularak 2 saat içinde tüketilirse zehirlenme riski ciddi şekilde azalır.

Cl. perfringens zehirlenmelerinin çok büyük çoğunluğu, toplu tüketimde görülür. Bireysel zehirlenmeler nadirdir ya da sağlık kayıtlarına geçmemektedir. Yemeğin pişirilmesi sırasında vejetatif hücreler ölür, sporlar canlı kalır. Soğutma sırasında *Cl. perfringens* spor sayısında önemli bir değişiklik olmaz. Yemeğin servis edilmesi öncesi, yetersiz ısıtma sonunda sporlar çimlenir ve servis öncesi uzun süre beklenildiğinde sayı çok hızla artar ve porsiyondaki sayı 10^6 KOB/g sayısına rahatlıkla ulaşır. Yemeğin hafifçe ısıtılması sporların çimlenmesini teşvik eder.

[23] Çeşitli gıdalarda <100 KOB/g *Cl. perfringens* bulunmasına izin verilmektedir.

Patojenitesi

Cl. perfringens tarafından oluşturulan hastalığa, perfringens gıda zehirlenmesi, zehirlenme, gıda kaynaklı hastalık, enfeksiyon ve enfeksiyon tipi gıda zehirlenmesi adları verilmiştir. Bütün bu farklı tariflerin nedeni, toksin salgılanmasının *Staph. aureus* ve *Cl. botulinum*'dan değişik olmasından ötürüdür. Hastalığa ait gerçek rakamların bulunmamasının nedeni, semptomların hafif olması ve hastalığın doktor müdahalesine gerek kalmadan kısa sürede geçmesidir. Genel olarak yaşlı ve düşkün kişiler *Cl. perfringens* zehirlenmelerine daha fazla duyarlıdırlar.

Hastalığa yol açan enterotoksin (CPE), 3,5 kDa molekül ağırlığındadır ve tek bir polipeptit zinciridir. *cpe* geni, genomda ya da plazmitte bulunabilir. Ancak zehirlenmeye neden olan genin her zaman genomda olduğu belirlenmiştir. Her *Cl. perfringens* suşunda bu gen yoktur. Bir diğer deyişle, her *Cl. perfringens* suşu hastalığa yol açmaz.

Cl. perfringens zehirlenmelerinde ishal ve karın krampları 6-24 saat (genellikle 8-12 saat) içinde görülür. Bu süre, farklı kaynaklarda 8-15 ve 8-22 saat olarak da verilmektedir. Hastalık genellikle aniden başlar genellikle 24 saatte biter. Kusma ve yüksek ateş görülmez ya da çok nadirdir. Zayıf bünyeli kişilerde sıklıkla halsizlik de olur. Gençlerde hastalık hafif geçer, yaşlı ve hasta kişilerde daha şiddetli cereyan edebilir. Dehidrasyon[24] ve başka hastalıklarla komplikasyon halinde ölüm bildirilmiştir.

Rehidrasyon[25] yaşlılarda ve zayıf bünyelilerde gerekebilir. Bazı hastalarda hastalık daha sert geçer ve 1-2 hafta kadar sürer. Hastalığın ortaya çıkması için 10^8 sayıda canlı hücrenin bağırsağa ulaşması ve toksin oluşturması gerekir. 10^6 sayıda bakterinin gıda ile alınması halinde bağırsaklara ulaştığında bu sayı $10^{8'}$e çıkmaktadır.

Salmonella gibi tipik bir enfeksiyon tip hastalık değildir. Bu nedenle kişiden kişiye bulaşma olmaz.

Tespit edilen dört ana tip ekzotoksin, alfa (α), beta (β), epsilon (ε) ve iota (i)'dır. Bunların oluşturulma durumuna bağlı olarak *Cl. perfringens* suşları, A, B, C, D ve E olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır.

Cl. perfringens Tipleri	Oluşturulan Ana Toksinler
A	Alfa
B	Alfa, Beta, Epsilon
C	Alfa, Beta
D	Alfa, Epsilon
E	Alfa, Iota

[24] İshale (ya da susuzluğa) bağlı olarak vücutta aşırı su kaybı

[25] Dehidrasyona bağlı aşırı su kaybının serum verilerek telafisi

Bu toksinlerden alfa genomda, diğerleri plazmitte kodlanmıştır.

Alfa toksin, bütün gruplar tarafından oluşturulabilmekle beraber gıda kaynaklı hastalıklara neden olan temel tip A'dır. Bazı hallerde C tipinin de zehirlenmelere neden olduğu belirtilmektedir. Bütün A tipleri toksin oluşturmadığı gibi gıda zehirlenmesine neden olan ve gıdalardan izole edilenler bu özelliklerini laboratuvar besiyerine transfer edilince yitirebilmektedir.

Hastalığın etiyolojik ajanı *Cl. perfringens* enterotoksini olarak adlandırılmıştır. *S. aureus* ve *Cl. botulinum* toksinlerinin aksine *Cl. perfringens* enterotoksinine normal olarak gıdalarda rastlanmaz. Bunun yerine toksin bağırsak sisteminde *Cl. perfringens* gelişmesi ve sporlanması ile oluşur. Laboratuvar koşullarında sporlanmayı teşvik eden ortamlarda bakterinin toksin oluşturması mümkün olmuştur. Enterotoksin proteininin, spor kılıfında yapısal bir kısım olduğu ve bazı türlerce aşırı olarak oluşturulduğu ileri sürülmektedir.

Sporlanma ile toksin oluşumu arasında doğrudan bir korelasyon mevcuttur. Sporlanmanın engellendiği besiyerinde enterotoksin oluşmamakta, ancak sporlandırma besiyeri kullanıldığında toksin sentezlenmektedir. Enterotoksin ancak spor oluşturan hücrelerin lize olması ile ortama salınır. Spor kılıfının (coat) oluşumu, sporlanmanın ilk basamaklarından biridir. Nitekim enterotoksin de spor oluşumunun başlangıcından 4 saat sonra saptanmakta ve 10-11. saatlere kadar birikmeye devam etmektedir. Lizis olayı ile enterotoksin ve olgun sporlar ortama yayılır. Bununla beraber, yapılan son çalışmalarda spor oluşturmayan kültürlerde de toksin saptanmıştır. Bu sonuç, toksin oluşumu ile sporlanma arasındaki ilişkiyi ortadan kaldırmakta, toksin oluşumu ve sporlanmanın benzer çevre koşullarında tesadüfen beraberce olabileceği düşüncesini ortaya çıkartmaktadır.

Saflaştırılan toksin, protein yapısındadır ve nükleik asit, yağ asidi, fosfotit ve indirgen şekerleri içermez. Hidroliz ile 18 aminoasit elde edilmiştir. En önemlileri aspartik asit, serin, leucin ve glutamik asittir. Molekül ağırlığı 33.000-40.000 Da arasındadır. İzoelektrik noktası pH 4,3'tür. Bu enterotoksin ısıya dayanıksız olup 60 ^{o}C'ta 4 dk'da aktivitesinin %90'ını yitirir. Protein yapısında olması nedeniyle antijenik karakterdedir. Ancak şimdiye kadar bu toksini oluşturan bakterinin suşuna bağlı olmayarak sadece bir adet antijenik enterotoksin tipi saptanmıştır.

Hastalığa neden olacak *Cl. perfringens* adedi kesin olarak saptanamamış olmakla beraber gıdada 10^6 KOB/g hücre olması tehlike işaretidir. *Cl. perfringens*, önce midenin yüksek asitliğinden geçip bağırsaklara ulaşmak zorundadır. Gelişmeye hazırlanma fazının başlangıcındaki bakteriler en dayanıksız durumdadır. Dayanıklılık, gelişme fazının sonunda maksimuma ulaşır. Tüketilen gıdada proteinlerin bulunması *Cl. perfringens* hücrelerini mide asitlerine karşı korur. Mide asidinin tüketilen proteinlerle birleşmesi pH'da genel bir yükselmeye neden olur. Proteinlerin mide asidi üzerindeki bu etkisi bakterilerin korunmasını sağlar. Proteinli gıdaların bu hastalığa daha fazla yol açmasının nedenlerinden birisi de budur.

Canlı kalan hücreler ince bağırsağa ulaşınca gelişme ve sporlanma için uygun bir ortam bulurlar. Spor oluşturan hücreler, enterotoksin oluşturur ve hücre lizisi sonunda toksin ortama salınır.

Cl. perfringens uygun koşullar bulduğunda bazı gıdalarda da spor oluşturabilir ve hücrelerin lizisi sonunda gıda toksik bir hale gelebilir. Bu koşulda gıda, duyusal olarak tüketilemeyecek bir duruma geçer. *Cl. perfringens* sporlanması için 7-12 saat gereklidir. Enterotoksinin gıdada daha önce oluşması, çok yüksek sayıda hücrenin gıda ile birlikte alınması ve gıdayı tüketen kişinin hassasiyeti, inkübasyon süresinin kısalmasına neden olur. Bu durum, çok yüksek düzeyde toksin oluşturan suşların gıdada gelişmesi ve gıdanın henüz duyusal olarak bozulmuş olmadığı koşullarda gerçekleşebilir.

Bulaşık gıdayı tüketen herkes hastalanmayabilir. Mide asitliği yüksek olan bazı kişiler hastalıktan kurtulabilirler. Daha önce zehirlenmiş olmanın hiçbir koruyucu etkisi yoktur. İyileşme tam ve herhangi bir belirti bırakmadan olur. Hasta halsiz kalırsa da kısa zamanda düzelir. Belirtilerin hafif ve kısa süreli olması nedeniyle genellikle bir tedavi uygulanmaz.

Toksin kapiler geçirgenliği artırarak bağırsaklarda aşırı sıvı hareketine neden olur ve ishal görülür. Peristaltik bağırsak hareketleri artar.

Daha ciddi fakat daha nadir olan bir hastalık ise *Cl. perfringens*'in C tipleri tarafından oluşturulan necrotican (çürütücü) hastalığıdır. Son zamanlarda A tipinin de bu hastalığa yol açtığı saptanmıştır. "Pig-bel" ve "necrotic perfringens" olarak da bilinen bu hastalık sıklıkla öldürücüdür. Çok sayıda bakterinin vücuda alınması ile başlar ve bağırsak duvarına yapışarak β toksin oluşturur, bağırsakta enfeksiyon ve septisemiye yol açar ve tedavi edilmez ise bağırsak nekrozu (çürüme) kangrene kadar gider ve sonunda ölüm görülür. ABD'de çok nadir görülen bu hastalık ilk kez 1949 yılında Almanya'da görülmüştür. Papua Yeni Gine'de çok yaygın iken aşılama ile kayda değer ölçüde azaltılmıştır.

Cl. perfringens, klinik mikrobiyolojide *Cl. welchii* adı ile bilinir. Gazlı kangrene neden olan önemli bir patojendir. Gazlı kangren, açık yaradan *Cl. perfringens* (syn *Cl. welchii*) bulaşması sonucu görülen çok tehlikeli bir hastalıktır. Buna bağlı olarak, *Cl. perfringens* şüphesi ile analiz edilen gıdalarda laboratuvar personeli gerekli güvenlik önlemini almalıdır.

Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Kırmızı et ve kümes hayvanları ürünleri, önceden pişirilip soğutulmuş her türlü et yemekleri, baharatın yoğun olarak kullanıldığı soslar *Cl. perfringens* açısından riskli gıdalar olarak tanımlanır. Bu zehirlenmeye genellikle proteinli gıdalar yol açar. Izgara etler, kaynatılmış veya hafif kızartılmış kırmızı ve beyaz etler, et suyu, sosisler, çorbalar, etli börekler ve et salataları en önemli gıdalardır. Zehirlenmeye neden olan gıdalar öncelikle bir iki gün önce pişirilip buzdolabında tutulmuş ve yeniden, ancak hafifçe ısıtılarak tüketilenlerdir.

Etler büyük parça halinde pişirildiğinde ısının transferi ve piştikten sonraki soğuma yavaş olduğu için ısıtma ile ortamdan oksijenin uzaklaşması ile oluşan anaerobik koşullar, ortamı *Cl. perfringens* gelişmesine ideal bir hale getirir.

Cl. perfringens kaynaklı hastalık, et veya piliç gibi gıdalarda pişirildikten sonra yeteri kadar soğutulmayan ya da servis öncesi yeteri kadar ısıtılmayan gıdalarda görülür. *Cl. perfringens*, çiğ et, piliç, kurutulmuş çorbalar ve soslar, çiğ sebze ve baharatta doğal olarak az sayıda bulunabilir. Bazı suşlarının sporları 100 ^{o}C gibi yüksek sıcaklıklara 1 saat kadar dayanıklı oldukları için gıdalarda *Cl. perfringens* varlığı bir anlamda kaçınılmazdır. Ayrıca pişirme/ ısıtma sırasında azalan oksijen miktarı anaerop karakterli olan *Clostridium* türlerinin gelişmesine olanak sağlar. Pişirme sırasında canlı kalan sporlar, pişirme sonrası yeterli soğutma sağlanmazsa çimlenip hızla çoğalırlar. Klinik ve epidemiyolojik veriler, *Cl. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenmelerinde en az 10^5 KOB/g sayıda bakterinin varlığını göstermiştir.

Cl. perfringens analizi 14.12. bölümde verilmiştir.

09.14. *Listeria monocytogenes*

Birçok çalışma, gıda işleme ortamlarında yaygın olarak *L. monocytogenes* bulunduğunu göstermiştir. *Listeria*, başta hammadde olmak üzere pek çok şekilde gıda işleme ortamına girebilir. Yetersiz temizlik ve sanitasyon uygulaması ve yetersiz kontrol nedeniyle gıda işletmelerinde gelişimini sürdürebilir. Özellikle şarküterilerdeki dilimlenmiş ve paketlenmiş et ürünlerinin ABD'de insan listeriyoz vakalarının %83'ünden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir.

Tanımı

L. monocytogenes, Gram pozitif, kısa çubuk şeklinde, spor ve kapsül oluşturmayan, aerobik ve fakültatif anaerop karakterli, katalaz pozitif ve oksidaz negatif bir bakteridir. Bütün *Listeria* türleri 30 ^{o}C altında peritrik flagellaları ile hareketlidir. Yüksek inkübasyon sıcaklıklarında (~37 ^{o}C) hareket özelliklerini yitirirler. Yarı katı agar besiyerindeki hareket testinde yüzeyin 3-5 mm altında açılmış şemsiye görüntüsü tipiktir. Çevreye geniş ölçüde yayılmış, psikrotrof karakterine bağlı olarak buzdolabı sıcaklığında gelişebilen, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma vb. gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığını koruyabilen önemli bir patojendir.

Bu patojene ilk olarak 1891 yılında Alman hastalardan alınan örneklerde rastlanmış, 1911'de İsveç'te tavşan ciğerinden izole edilmiş ve 1925 yılında Almanya'da koyunlarda görülmüştür. Hastalık 1917'de Pirie tarafından Güney Afrika bozkırlarındaki kemirgenlerde Tiger River adı ile tanımlanmıştır. 1926 yılında Murray ve ark., Cambridge'deki laboratuvar tavşanlarında septik bir

hastalık tarif etmişler ve hastalık monositozla[26] karakterize olduğu için etken bakteriye *Bacterium monocytogenes* adını vermişlerdir. Daha sonra bir cerrah olan Lord Lister'in anısına *Listerella hepatolytica* ve *Listerella hominis* gibi isimler verilen bu bakteriye 1940 yılında Pirie tarafından *Listeria monocytogenes* adı verilmiştir. Mikroorganizmada monosit üretici bir antijen tanımlanmasına rağmen insanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda monositoz belirleyici bir unsur değildir.

1990'lı yıllardan başlayarak geliştirilmiş olan kontrol önlemleri, başta et ve et ürünleri olmak üzere birçok gıda grubunda *L. monocytogenes* prevalansını[27] büyük ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte listeriyoz oranı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde son yıllarda sabit kalmış ve listeriyozun daha ciddi invaziv[28] formunun küçük salgınlarda daha önce bilinenden daha sık ortaya çıktığı fark edilmiştir.

Ekolojisi

L. monocytogenes, tarım, su ürünleri yetiştiriciliği ve gıda işleme ortamlarında geniş çapta görülen bir bakteridir. Yüksek nemli, yakın zamanda ekilmiş, sulanmış ya da yağmur yağmış topraklarda ve otlaklarda daha yüksek oranda bulunur. Aynı zamanda insan bağırsağında geçici süre barınır ve nüfusun %2-10'u sağlıklarıyla ilgili belirgin bir değişiklik olmaksızın bu bakterinin taşıyıcısı durumundadır.

Listeria cinsinin bütün türleri doğada çok yaygın olarak bulunur. Topraktan, sudan, çürümüş bitkilerden, gübreden, sebzelerden, hayvan yemlerinden, taze ve dondurulmuş kanatlı hayvan etlerinden, kesimhane artıklarından, sağlıklı insan ve diğer hayvan türlerinin dışkılarından izole edilebilir. Süt ürünleri, et, sebze ve su ürünleri gibi çiğ ve hazır gıdalardan ve gıdaların hazırlandığı ortamlardan izole edilmiştir.

Dolayısıyla *Salmonella*, *E. coli* (EHEC serotipleri), *Shigella* gibi sadece bağırsak kökenli bir bakteri değildir. Bir diğer ifade ile *L. monocytogenes* izole

[26] Monositoz, kanda normalde alyuvarların %2-6'sını oluşturan bir hücre türü olan monositlerin sayıca artmasıdır. Pek çok hastalıkta görülen önemli bir laboratuvar bulgusudur. Monositler, fagositlerin bir bölümüdür. Fagositler ise primer lökositler sınıfında olup vücüt savunma sisteminde görev yapan hücrelerdir.

[27] Prevalans, prevalans hızı veya prevalans oranı: Belirli bir nüfusta, belirli bir zaman dilimi içerisinde çalışma kapsamında yer alan belirli bir hastalık veya hastalıklara sahip tüm olguların oranıdır. Prevalans, epidemiyoloji ve birçok sosyal tıp biliminde sıklıkla kullanılır.

[28] İnvaziv (invasive), bir mikroorganizmanın bir konağa girme, orada gelişebilme ve konağın vücudunda yayılarak gelişme yeteneği. İlerleme gösteren, özellikle komşu dokulara doğru yayılma gösteren.

edilen bir gıdada ya da çevresel numunede fekal kontaminasyondan bahsedilemez.

Hollanda'daki çiftlik hayvanlarında listeriozisin[29] belirli coğrafi bölgelerde yaygın olduğu ve bu bölgelerde düşük kalitede yem kullanıldığı belirlendikten sonra yem hazırlama standardının geliştirilmesine bağlı olarak hastalığın çok önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır.

Toprakta canlılığını sürdürmesi, toprak tipi ve koşullarına göre değişir. Nemli ve organik madde içeriği yüksek olan topraklarda kuru ve düşük organik madde içeriği olan topraklarda olduğundan daha uzun süre canlılığını korur.

L. monocytogenes süt sığırı, keçi, koyun, balık gibi birçok omurgalı ve omurgasız hayvanlarda parazit olarak yaşar. Evcil hayvanlar, kuşlar, balıklar, memeli hayvanlar ve taşıyıcı insanların dışkılarından izole edilebildiği için bitkisel ve hayvansal gıdalarda *Listeria* bulunması bir anlamda kaçınılmazdır. Burada bir döngü söz konusudur.

Enfekte olmuş hayvanlardan *Listeria*'nın etrafa yayılması toprak ve tarla kontaminasyonuna ve tarladan elde edilen yeşil yemlerin kontaminasyonuna, buradan da et ve süt hayvanlarına tekrar geçmesine neden olur. Döngü devam ederken bulaşık sebze, meyve, süt ve etten bakterilerin insanlara geçişi gerçekleşir.

Sınıflandırılması

Önceden *Corynebacteriaceae* familyası içinde bulunan *Listeria* cinsi, sonra *Clostridium-Lactobacillus-Bacillus* grubuna dâhil edilmiş, 2011 yılında yayımlanmış olan "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three" kaynağına göre en son olarak *Bacilli* sınıfı, *Bacillales* takımı, *Listeriaceae* familyasına yerleştirilmiştir. Bu familya içinde *Listeria* ve *Brochothrix* cinsleri bulunur.

Listeria cinsi, daha önceki yıllarda *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* ve *L. grayi* olmak üzere 6 tür içermekle beraber 2009 yılından başlayarak bu cinse 11 yeni tür eklenmiştir.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve Kontrolü

Birçok *L. monocytogenes* suşu gıdalardaki yüksek tuz, asitlik, düşük nem ve düşük oksijen varlığına nispeten dirençlidir. *Listeria* gelişiminin düşük sıcaklıklarda önemli ölçüde azalmasına rağmen laboratuvar koşullarında 0,5 °C'ta bile geliştiği ve canlı kaldığı bulunmuştur. Gıdalardaki gelişim ve canlı kalma potansiyeli, laboratuvar koşullarında gözlemlenenden daha düşüktür. *L. monocytogenes*'in ekolojik ve fizyolojik özellikleri, gıda işletmelerinde kolonize olmasını, işleme/ saklama aşamasındaki engelleri aşarak canlı kalmasını mümkün hale getirmektedir.

[29] Listeriozis, *L. monocytogenes* tarafından oluşturulan hastalık.

Fakültatif anaerop karakterlidir. Optimum gelişme sıcaklığı, 30-35 ºC olup 0-45 ºC gibi geniş bir aralıkta gelişebilir. Halotoleranttır ve dolayısıyla yüksek derişimde NaCl (%10-12) varlığında bile gelişebilir. %25,5 NaCl içeriğinde ve 4 ºC'ta aylarca canlı kalabildiği saptanmıştır. Minimum A_S değeri 0,92 (mutfak tuzunda) olarak belirlenmiştir. *L. monocytogenes*, pH 4,1-9,6 aralığında ve optimum olarak pH 6,0-8,0'de gelişir.

L. monocytogenes'in toprakta 2-6 ay, koyun dışkısında 3 ay, sığır dışkısında 16 ay ve çeşitli gıda maddelerinde 5-26 ay kadar canlı kaldığı belirlenmiştir.

Sütlerin 0 ºC'ta depolanmasında bakterinin canlı kalması yanında gelişmesini de sürdürdüğü görülmüş, buna dayanarak soğutmanın *L. monocytogenes*'e karşı yeterli bir koruma yöntemi olmadığı sonucuna varılmıştır. 1948 yılında Gray ve ark. 4 ºC'ta soğukta ön zenginleştirme işlemiyle bakteri sayısını artırmayı başarmıştır. Bu analiz yöntemi, 1980'li yıllara kadar kullanılmıştır, ancak yöntemin en büyük dezavantajı 1-2 ay gibi uzun bir inkübasyon süresinin olmasıdır. *L. monocytogenes* gibi psikrotrofik bakterilerin soğuk stresine karşı koyabilmek için soğuk şoku proteinleri adı verilen özel proteinler sentezlediği günümüzde bilinmektedir.

L. monocytogenes'in sıcaklığa karşı direnci konusunda değişik görüşler bulunmaktadır. Kimi kaynaklar, 60 ºC'ta 30 dk ısıtma işlemi sonunda bakterinin canlı kalmayacağını belirtirken başka araştırmalarda sütün 61,7 ºC'ta 35 dk pastörizasyonu sonunda bakterinin $5x10^3$ KOB/mL düzeyinde canlı kalabildiği görülmüştür. Bu nedenle peynir yapılacak çiğ süte uygulanacak pastörizasyon işleminde sıcaklığın 72 ºC'ın altına düşürülmemesi önerilmektedir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre peynir yapımında kullanılacak çiğ sütler 71,7 ºC'ta 15 sn süreyle pastörize edilmelidir. Bu ısıl işlem uygulamasının çiğ sütlerdeki *L. monocytogenes* düzeyini insan sağlığı açısından risk oluşturmayacak bir düzeye indirdiği bildirilmesine rağmen çok nadir olarak bu uygulamada bakterinin canlı kalabildiği belirlenmiştir.

İspanya'da yapılan bir çalışmada 78 ºC'ta 15 saniye pastörize edilmiş süt örneklerinin %21'inden *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Olgunlaştırılmış Cheddar peynirinde *L. monocytogenes*'in 400 günden fazla canlı kaldığı belirlenmiştir. Tavuk suyunda -0,4 ºC kadar düşük sıcaklıkta dahi bakterinin gelişimi gözlenmiştir.

Hindi eti ve sosislerde -18 ºC'ta 8 hafta depolamadan sonra bu patojenin sayısında sadece 1-3 log birimlik azalma olduğu bildirilmiştir.

L. monocytogenes, orta derecede asitli (pH 5-6) ortamlara belirli bir süre maruz kalırsa spesifik genler tarafından kontrol edilen asit şok proteinleri sentezleyerek yüksek asitli ortamlarda canlılıklarını sürdürebilir. pH 2,5'te 2 saat süreli asit stresi altında bekletilen suşlardan gıda kaynaklı olanların klinik kaynaklı olanlara göre aside karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Ancak düşük pH'lı ürünlerin de salgınlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bir çalışmada tavuk etinden yapılmış hamburgerlerde sodyum laktat ilavesinin antilisteriyal (listerisidal)[30] etkileri olduğu ve %2,5 sodyum laktat eklenmesinin *L. monocytogenes* gelişimini tamamen engellediği ve sodyum sitrat için bu oranın %7 olduğu belirtilmiştir. Nisin ve pediosin gibi bakteriyosinler *L. monocytogenes* gelişimini engeller. Yapılan bir başka çalışmada 125 IU nisin kullanımının 4-6 saat gibi kısa bir sürede bu patojenin sayısında yaklaşık 4 log birimlik bir düşüşe neden olduğu bulunmuştur.

Potasyum sorbat (%0,2) ve sodyum benzoat (%0,1), 13 ^{o}C'ta ve pH 5,0'de bu bakterinin gelişimini inhibe eder. Nitritin *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisi, gıdalarda bulunmasına izin verilen derişimin çok üzerindedir. Bir başka deyişle nitrit tek başına *L. monocytogenes* indirgemeye yeterli değildir. Nitrit, ancak 5 ^{o}C'ta pH <5,5 ve %3 NaCl varlığında etkili olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes*'in *Staph. aureus* ve *Enterococcus faecalis*'e kıyasla ozona karşı daha duyarlı olduğu belirlenmiş ve 0,4 ppm ozon uygulamasının 13 saniyede *L. monocytogenes* sayısında yaklaşık 7 log birimlik[31] azalma sağladığı belirlenmiştir.

Gıda sanayisinde *Listeria* türleri ve özellikle *L. monocytogenes* için faj içerikli preparatların kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Fajlar, konakçıya spesifik olup hedef bakteriyi bir anlamda yok etmektedir.

Patojenitesi ve Önemli Serotipler

1990'lı yıllardan başlayan geliştirilmiş kontrol önlemleri, başta et ve et ürünleri olmak üzere birçok gıda grubunda *L. monocytogenes* prevalansını büyük ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte listeriyoz oranı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde son yıllarda sabit kalmış ve listeriyozun daha ciddi olan invaziv formunun küçük salgınlarda daha önce bilinenden daha sık ortaya çıktığı fark edilmiştir.

Çeşitli *Listeria* türleri içinde *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* insanlarda hastalığa neden olur. Zaman içinde başka türlerin de insanlarda hastalığı neden olduğu gösterilmişse de insan patojeni *Listeria* denildiğinde öncelikle *L. monocytogenes* akla gelir.

---

[30] Antilisteriyal (listerisidal) uygulama: *L. monocytogenes* üzerinde indirgeyici her türlü uygulama.

[31] 7 log birimi azalma %99,99999 indirgeme, bir başka ifade ile örneğin, 10^{9} KOB/g'dan 10^{2} KOB/g sayıya azalma anlamındadır. 7 D indirgeme de aynı anlama gelir. Isıl işlem, kimyasal madde (gıda koruyucuları) ve ışınlamada mikroorganizma indirgeme etkisi genel olarak logaritmik değer ile ifade edilir. Basit bir yıkama ile ellerdeki mikroorganizma yükünde 2 log KOB/ cm^{2} azalma (%99) sağlanır. Sabunla el yıkamada bu değer yaklaşık 3 log birimidir. Dezenfektanlı sabunlarla el yıkamada ise dezenfektanın gücüne göre indirgeme farklı olur.

L. monocytogenes, gıda kaynaklı hastalıkların önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. Çoğu durumda hafif ve ateşli bir hastalık olarak ifade edilmesine karşın daha ciddi belirtiler ve yüksek hastaneye yatma ve ölüm oranına sahip invaziv listeriyoz da görülebilmektedir. Sistemik listeriyoz insidansı[32] ise gebeler, yenidoğan bebekler, yaşlılar ve bağışıklık sistemi zayıflamış bireyler (kanser, şeker, böbrek ve AIDS hastaları) gibi duyarlı popülasyonlarda (risk grubu) daha yüksektir.

L. monocytogenes, gelişmiş ülkelerde nadiren gıda kaynaklı hastalıklara neden olmakla beraber invaziv listeriyozda enfekte olan kişilerin %20-40'ı bu nedenle ölmektedir. Bu, diğer gıda kaynaklı hastalıklara göre yüksek bir orandır.

L. monocytogenes suşlarının virulans açısından farklı olduğu bilinmektedir. Örneğin, ABD'deki birçok salgın, serotip 4b ile ilişkilidir.

L. monocytogenes'e maruz kalma ile hastalık başlangıcı arasında genellikle birkaç haftalık uzun süre geçmesi, insana ait epidemiyolojik verilerden doğru doz bilgisini elde etmeyi zorlaştırmaktadır.

Menenjit, septisemi, beyin iltihabı, karaciğer apsesi, endokardit, gebelerde düşük veya ölü doğumlara neden olmaktadır. En sık görülen bulaşma yolu kontamine gıdaların tüketilmesidir. Anneden bebeğe geçişin mümkün olduğu, bunun dışında insandan insana geçmesinin çok nadir olduğu belirtilmiştir.

L. monocytogenes'in neden olduğu listeriozisin mekanizması tam olarak açıklanabilmiş değildir, ancak *L. monocytogenes*'in, β-Listeriolizin adı verilen bir hemolisin üretimine bağlı olarak patojenite gösterdiği bilinmektedir. Listeriolizin, hücrelerin sitoplazmik membranlarında porlar açarak hücrenin geçirgenliğini bozan ve parçalanmasına neden olan toksik bir maddedir.

Listeriozis görülen kişilerde ölüm oranı %20-40 arasında değişirken yeni doğanlarda bu oran %80'e kadar çıkmaktadır. Hastalık yapıcı doz 100 canlı hücrenin üzerinde gibi görünmesine rağmen henüz kesin olarak bilinmemektedir. Ancak epidemiye neden olan bir peynirde *Listeria*'nın 10^3-10^4 KOB/g düzeyinde bulunması bir fikir vermektedir.

L. monocytogenes içeren gıda tüketildikten 12 saat sonra ateş, karın krampları, diyare, yorgunluk, baş ağrısı ve kusma ile seyredebilen gastrointestinal bir sendrom ortaya çıkar. Listeriyal menenjit ve bakteriyemi gibi daha ciddi durumlar ancak günler veya haftalar sonra görülür. Bu sendromların başlama süresi 11-70 gün arasında (ortalama 21 gün) değişmektedir. Bu süre, enfektif doza ve hastanın durumuna bağlıdır.

[32] İnsidans, insidans hızı (IH) veya insidans oranı: Belirli bir nüfusta belirli bir zaman dilimi içerisinde belirli bir hastalık veya hastalıkların yeni olgularının sayısını ifade eder. Epidemiyoloji ve birçok sosyal tıp biliminde sıklıkla kullanılır. Sık sık prevalans hızı ile karıştırılır.

Santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonu, listeriyal enfeksiyonun en sık görülen formudur ve ölüm oranı %30'dan fazladır. SSS enfeksiyonu menenjit, meningoensefalit veya apseler şeklinde kendini gösterebilir.

Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Gıdalar, listeriyozun ana araçları olup ABD'de listeriyoz vakalarının %99'unun gıda kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir. Tüketime hazır gıdalar normalde çiğ olarak yenilen veya işlenmiş, pişirilmiş veya başka listerisidal uygulama basamağı içermeyen formda hazırlanmış gıdalardır. Sporadik vakalar ve listeriyoz salgınları, genellikle buzdolabında ya da soğuk ortamlarda tüketim anına kadar yüksek sayıda gelişime olanak verecek şekilde uzun sürelerde tutulan tüketime hazır gıdalarla ilişkili bulunmaktadır.

L. monocytogenes açısından en riskli gıdalar, tüketime hazır ve soğukta uzun süre depolanmış ve dolayısı ile *L. monocytogenes*'in gelişebildiği ve 100 KOB/g'dan fazla sayıda *L. monocytogenes* içeren gıdalardır. Bu bakterinin buzdolabı sıcaklığında da çoğalabilmesi ve gıdalarda kullanılan pek çok koruyucu maddeden etkilenmemesi nedeniyle listeriyozis salgınlarına neden olmaktadır.

1980'li yıllarda özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkeleri başta olmak üzere pek çok ülkede bu hastalığın neden olduğu salgınlar görülmüş ve gıdalar aracılığı ile taşınan bu patojene dikkat çekilmeye başlanmıştır. Büyük listeriyozis salgınlarında enfeksiyon kaynağı olarak yumuşak peynir (Meksika tipi), çiğ lahana, ciğer ezmesi ve jöleli domuz dili bulunmuştur.

Hastalığa neden olan gıdalar arasında çiğ ya da pastörize süt, dondurma, çiğ sebze ve meyveler, fermente et ürünleri, çiğ veya pişmiş her çeşit et, çiğ veya tütsülenmiş balık, kabuklu deniz ürünleri, starter kullanılmadan üretilen taze peynirler, yumuşak peynirler, tüketime hazır yiyecekler, ısıl işlem görmüş jambon, çeşitli sosis ve salamlar ile lahana salatası sayılabilir.

Türkiye'de et ürünleri üzerine yapılan bir çalışmada 200 adet et ürününün 71 adedinde *L. monocytogenes* varlığı gösterilmiş ve özellikle kokoreç, ızgara şiş köfte, ızgara köfte ve ızgara balığın yüksek risk taşıyan gıdalar olduğu bildirilmiştir. Ayrıca vakumla paketleme, 0 ^{o}C ve 4 ^{o}C'ta muhafaza işlemlerinin İnegöl köftelerde *L. monocytogenes* riskini ortadan kaldırmadığı ve tüketilmeden önce köftelere yeterli pişirme işleminin uygulanmasının önem kazandığı belirtilmiştir.

Oldukça ilginç olarak ABD'de 19 eyalette görülen kavun kaynaklı *L. monocytogenes* salgınında 84 kişi hastalanmış ve 15 kişi ölmüştür. Salgının 31 Temmuz 2011 tarihinde başladığı tahmin edilmektedir. FDA, 14 Eylül 2011 tarihinde salgını fark etmiş ve acil basın açıklaması yapmış ve söz konusu markanın kavunları piyasadan toplatılmıştır. Kavunun kabuğuna kontamine olmuş bakteri, kesme sırasında iç tarafı da kontamine etmiş, bu şekilde buzdolabında uzun süre tutulan kavunda bakteri sayısı, hastalığa neden olacak

kadar yükselmiştir. Kavun, bütün halde buzdolabında saklanıp yenileceği zaman kesilip hemen tüketilse herhangi bir sorun olmayacak idi.

Dondurulmuş mısır ve muhtemelen diğer dondurulmuş sebzeler 2015 yılından günümüze kadar Avusturya, Danimarka, Finlandiya, İsveç ve İngiltere'de *L. monocytogenes* kaynaklı hastalanmalara neden olmaktadır. 15 Haziran 2018 tarihi itibariyle 9 ölüm olan 47 vaka bildirilmiştir. Aynı *L. monocytogenes* suşları, aynı Macar firması tarafından 2016, 2017 ve 2018'de üretilen dondurulmuş sebzelerde tespit edilmiştir.

Çeşitli ülkelerde 2010 yılı sonrasında makine ile kesilerek dilimlemiş kereviz, dondurma, maş fasulyesi filizi, karamel kaplı elma şekeri ve karışık meyve suyunda *L. monocytogenes* ile ilişkili listeriyozlar ve ölümler görülmüştür.

L. monocytogenes, Türkiye'nin önemli ihraç ürünlerinden birisi olan dondurulmuş kırmızıbiberde, 2000'li yılların başında oldukça önemli sorun çıkarmıştır. 2010 yılında çiğ hamburgerlerde rastlanması da ciddi bir krize neden olmuştur.

Gıdalarda İzin Verilen *L. monocytogenes* Sayısı

Farklı ülkelerdeki yasal mikrobiyolojik kriterlere göre *L. monocytogenes* varlığına izin verilebilmektedir. Gıdalarda *L. monocytogenes* varlığına izin verilmede temel kriter, gıdada *L. monocytogenes* gelişmemesi ve sayısını artırmamasıdır.

ABD yasalarına göre gıdalarda 25 g(mL) düzeyinde *L. monocytogenes* bulunmasına izin verilmez.

Çin Halk Cumhuriyeti yasalarına göre dondurulmuş gıdalar hariç olmak üzere soğutulmuş gıdalar ve bebek mamalarında 25 g(mL) düzeyinde *L. monocytogenes* bulunmasına izin verilmez. Tüketime hazır diğer gıdalarda <20 KOB/ g *L. monocytogenes* bulunabilir.

AB yasalarına göre bebek gıdaları ve özel tıbbi (medikal) amaçlı gıdalarda 25 g(mL) düzeyinde *L. monocytogenes* bulunmasına izin verilmez. Bunların dışında tüketime hazır gıdalarda <100 KOB/ g(mL) izin verilmektedir.

Tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* gelişmesini/ sayı artırmasını kısıtlayan faktörler şu şekilde tanımlanmıştır:

-Diğer tüm gelişme faktörlerinden bağımsız olarak pH'sı 4,4 altındaki tüm gıdalar,

-Diğer tüm gelişme faktörlerinden bağımsız olarak su aktivitesi <0,92 gıdalar,

-pH <5,0 ve beraberinde su aktivitesi <0,94 olan gıdalar,

-Soğutulmuş ve raf ömrü ≤5 gün olan gıdalar,

-Dondurulmuş ve tüketim öncesi çözülmesi gereken gıdalar,

-Üretici firma tarafından raf ömrü boyunca *L. monocytogenes* sayısının, üründe 0,5 log KOB düzeyini aşmayacağı garanti edilen gıdalar,

-Raf ömrü boyunca listerisidal bir uygulama olmamasına rağmen üretici firma tarafından 100 KOB/ g(mL) düzeyini geçmeyeceği garanti edilmiş gıdalar.

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde daha önce çiğ et dâhil hiçbir gıdada 25 g numunede *L. monocytogenes* bulunmasına izin verilmezken 2010 yılındaki hamburger krizinden sonra 2011 yılındaki değişiklik ile çiğ et ürünlerinde *L. monocytogenes* kontrolü kaldırılmıştır.

L. monocytogenes analizi 14.13. bölümde verilmiştir.

09.15. *Staphylococcus aureus*

Tanımı

Staphylococcus aureus, fakültatif anaerobik, Gram pozitif, katalaz pozitif, mikroskopta kok şeklinde görülen bir bakteridir. Cins adını, mikroskopta genellikle üzüm salkımı şeklinde görülen kok formundan alır. *Staphylo*, Yunancada üzüm anlamına gelmektedir. Ancak bu cinsin üyeleri mikroskopta monokok, diplokok, kısa zincirli streptokok, tetrat formunda da görülebilir. Tür adını ise genel besiyerlerinde altın (*aureus*⇒ Au) sarısı renkli koloni oluşturmasından alır.

Hareketsizdir ve spor oluşturmaz. Hücre duvarı lizozime dirençlidir. Önceki sınıflandırmalara göre *Micrococcaceae* üyesi iken güncel kaynaklara göre *Staphylococcaceae* üyesi olarak sınıflandırılmıştır. 2014 yılı kaynaklarına göre *Staphylococcus* cinsinin 43 türü vardır. Bu cinsin üyelerinden *Staph*. *carnosus*, sucuk gibi fermente et ürünlerinde starter kültür olarak kullanılır.

Staph. aureus suşlarının çoğu, gıdalarda geliştiğinde stafilokokal enterotoksin (SE) salgılayarak intoksikasyon tip gıda kaynaklı hastalıklara neden olur. Gıdalarda bu bakteriye rastlanması hijyen eksikliğinin göstergesi olarak kabul edilir. İnsanlarda menenjit, septisemi ve iltihaplı yaralara ve eklem romatizmalarına neden olabilir.

Ekolojisi

Staph. aureus, en yaygın olarak insanlarda ve pek çok evcil/ çiftlik hayvanlarının burun ve boğaz boşluğunu örten mukoz dokuda yer alır. Deride, yüzde, ellerde, kıllarda ve kollarda insan ve hayvanların dışkılarında, özellikle apseli yaralarda, sivilce ve çıbanlarda yoğun olarak bulunur. Boğaz kültürlerinde ortamın dominant florası arasında *Staph. aureus* da vardır ve buradan izole edilen suşların %20'sinin enterotoksin oluşturduğu belirlenmiştir. Bir diğer deyiş ile *Staph. aureus* dâhil olmak üzere pek çok stafilokok türü, insanların ve hayvanların doğal florasıdır. Bu bakterinin doğal habitatı insan ve hayvanlardır.

Staph. aureus, süt hayvanlarında mastitis[33] hastalığının en önemli etmenlerinden birisidir ve mastitisli hayvan sütlerinde sıklıkla bulunur. Sağıcıdan da süte *Staph. aureus* bulaşabilir.

Gıda kaynaklı intoksikasyonlarda gıdaya *Staph. aureus* bulaşmasındaki en önemli etkenin insan olduğu saptanmıştır. İnsanlar taşıyıcı olarak bu bakteriyi diğer insanlara ve gıdalara bulaştırırlar. Benzer şekilde bakterinin hava, toz, lağım ve sudan kolaylıkla izole edilebilmiş olması gıdaların kontaminasyonu için çok sayıda kaynağın bulunduğunu göstermektedir.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve İndirgenmesi

Gelişme sıcaklığı 6-46 (optimum 30-37) ºC iken toksin oluşturması için gereken sıcaklıklar 10-48 ºC'tır. Kimi kaynaklar gelişme sıcaklık aralığını 7,0-48,5 ºC olarak vermektedir. 4,0-9,3 pH sınırları arasında (optimum 7,0-7,5) gelişir, toksin oluşturabilmesi için gereken en düşük pH 4,9-5,1'dir. Kimi kaynaklar gelişme pH aralığını 4,2-9,3 olarak göstermektedir.

Gelişebilmesi için gereken minimum su aktivitesi değeri aerop gelişme için A_s 0,83-0,86 ve anaerop gelişme için A_s 0,90 iken toksin oluşturabilmeleri için daha yüksek su aktivitesi gerekir. Tuz, tellurit, cıva klorür, sodyum azid gibi kimyasallar ile neomisin ve polimiksin gibi bazı antibiyotiklere dirençlidirler. %10 (kimi kaynaklara göre %15) NaCl varlığında gelişmesini kolaylıkla sürdürür. Bazı suşların %20 NaCl varlığında gelişebildiği saptanmıştır. Bu özellikleri, *Staph. aureus*'un çeşitli gıdalarda gelişebilmesini sağlar.

Spor oluşturmadığı halde vücut dışında canlılığını uzun süre koruyabilen tek insan patojenidir. Ağır metallere ve klinik mikrobiyolojide kullanılan pek çok antimikrobiyele karşı genetik olarak kazanılmış bir direnç sistemine sahiptir. Methicillin-resistant *Staph. aureus* (MRSA), hastane enfeksiyonlarında oldukça önemli bir klinik patojendir.

Tuza dayanıklılıkta en önemli ozmoprotektant[34] maddeler, hücre içine biriken glisin, betain ve prolindir. Yüksek tuz ortamına maruz bırakıldıktan sonra 3 dk'dan daha kısa bir sürede *Staph. aureus*'un prolin içeriğinde 21 misli artış olduğu belirlenmiştir. Bu özellikleri sayesinde tuzlu ve düşük su aktiviteli gıdalarda diğer bakteriler gelişemezken *Staph. aureus*, bunların rekabetçi etkisinden kurtularak daha rahat bir gelişme gösterir. Benzer şekilde gıdalarda *Staph. aureus* aranmasında/ sayılmasında yüksek tuz konsantrasyonlu besiyerleri kullanılarak refakatçi floranın gelişimi baskılanır.

Isıl işleme direnci düşüktür. Sütte belirlenen D_{60} değeri 3,1-3,4 dk'dır.

[33] Mastitis, insan dâhil tüm memeli hayvanlarda görülen meme yangısı.

[34] Ozmoprotektant, yüksek ozmotik basıncın olumsuz etkisinden koruyan.

Toksin Üretimi

SEler, asıl olarak A'dan E'ye kadar 5 ana gruba ayrılmıştır. Yeni tanımlanmış 22 toksin daha vardır. Bunlardan insanlarda kusturucu olmayanlar CE olarak isimlendirilmektedir. Toksik şok sendromu toksininin (SEF), gıda kaynaklı hastalıklara neden olan SEler içinde yer alıp almadığı günümüzde de tartışma konusu olmaya devam etmektedir.

SEler, protein yapısında olup, molekül ağırlıkları 22-29 kDa arasındadır.

Beslenme gereksinimleri açısından *Staph. aureus*, *Cl. perfringens* gibi müşkülpesent (özel istekleri olan) bir bakteridir. Bakteri gelişimi için valin, arjinin ve sistein, ayrıca SE üretimi için arjinin ve sistein gereklidir. Diğer aminoasitler için gereksinimler suşa göre değişmektedir. Glikozun özellikle SEB ve SEC'de, SE üretimi üzerinde engelleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin glikozun kullanılması sonucu olarak pH'da meydana gelen düşüşle bağlantılı olduğu açıklanmıştır. SE üretimi, nötr pH'da optimal olup asidik pH'da azalır. SE üretimi, pH <5'te engellenir. Yüksek NaCl derişimi asidik pH'nın engelleyici etkisini artırır. %12'nin üzerindeki tuz konsantrasyonlarında pH'dan bağımsız olarak SE üretimi gerçekleşmez. Öte yandan alkali pH'da SE üretimi azalır.

Staph. aureus, mikrobiyel rekabete oldukça duyarlıdır. Fermente süt ürünlerindeki rakip mikroflora konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa *Staph. aureus* gelişimi ve SE üretim oranı o kadar düşük olur. Çeşitli fermente gıdalardaki laktik asit starterlerinin *Staph. aureus* üzerinde indirgeyici etkisi pH'nın düşmesi, besin için rekabet ve bazen bakteriyosin gibi antimikrobiyel maddelerin sentezinden kaynaklanmaktadır.

Staph. aureus'ların tümü enterotoksijenik değildir. Yapılan çeşitli çalışmalarda gıdalardan elde edilen *Staph. aureus* izolatları içinde ne kadarının enterotoksijenik olduğu hakkında çok farklı oranlar elde edilmiştir. Tahminler, gıdadan gıdaya ve bir çalışmadan diğerine önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Yeni tanımlanan SEler dikkate alındığında enterotoksijenik suşların yüzdesinde zamana bağlı olarak büyük bir artış meydana geldiği görülmektedir. Bu çalışmalarda sıklıkla bulunan SEA, SEC ve SED'nin yanı sıra, SEG, SEI ve SEJ'nin de mastitisli sığırlardan izole edilen suşlarda baskın olan SEler olduğu ortaya konulmuştur. Bu durum, diğer gıda maddelerinde de geçerlidir.

Özellikleri

Staph. aureus'un dört önemli özelliği vardır. Bunlar enterotoksin oluşturması, koagülaz üretimi, lesitinaz aktivitesi ve termonükleaz aktivitesidir.

-Enterotoksinler: *Staph. aureus*, uygun gelişme koşullarında hızla çoğalır ve suşa göre değişmek üzere SEA, SEB, SEC_1, SEC_2, SEC_3, SED, SEE ile enterotoksijenik olduğu tam olarak kanıtlanmamış diğer toksinlerden bir ya da birkaçını oluşturabilir. Bunların dışında F toksini, diğerlerinden şok sendrom

adlı önemli bir toksik hastalıkla diğerlerinden ayrılır ve "Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1)" olarak adlandırılır. Bu toksinin etkisi Rhesus maymunlarında araştırılmış ve çok farklı hastalık belirtileri görülmüştür. Yapılan araştırmalarda ishal görülmemesine karşın akciğerlerde su toplanması (ödem), endotel hücrelerinin dejenerasyonu ve böbrek yetmezliği gibi önemli rahatsızlıklar ve şoka sokan bir toksik etki gözlenmiştir.

Staph. aureus enterotoksinleri içinde, en fazla toksik olanı enterotoksin A'dır. Buna karşılık SEB, ısıya en dayanıklı olanıdır. Aktif halde bulunan toksinlerin proteolitik enzimlere dirençli oldukları ve kolaylıkla parçalanmadıkları belirlenmiştir. Ancak pH 2,0'de, pepsine duyarlılıkları artmaktadır. *Staph. aureus*'dan başka enterotoksin oluşturan suşlar da vardır. *Staph. haemolyticus, Staph. cohnii, Staph. xylosus, Staph. equorum, Staph. lentus, Staph. capitis ve Staph. intermedius* suşlarının enterotoksin oluşturabildikleri saptanmıştır. Tersine olarak, *Staph. aureus*'un bütün suşları da enterotoksin oluşturmaz. Baird-Parker agar üzerinde bulunan atipik *Staph. aureus* kolonilerinin veya koagülaz negatif suşların da nadiren de olsa enterotoksin oluşturabildikleri görülmüştür. Çeşitli klinik kaynaklar ile gıdalardan elde edilen ve enterotoksin oluşturdukları saptanan *Staph. aureus* suşlarının % 93'ü koagülaz pozitif bulunmuştur. Saf enterotoksinler ısıya çok dayanıklıdır. Özellikle SEB'nin inaktivasyonu için yüksek sıcaklık dereceleri gereklidir. *Staph. aureus* enterotoksinlerinin inaktivasyonu için gerekli ısıl işlem 100 ^{o}C'de 1-3 saat veya 120 ^{o}C'de 10-40 dk'dır.

-Koagülaz aktivitesi: *Staph. aureus* suşları koagülaz enzimi üretirler. Koagülaz, trombin gibi kanda bulunan fibrinojene etki ederek onu fibrine dönüştürür ve koagülasyona neden olur. Bu test, tavşan kanı plazması ile yapılır. Plazmadan bir damla alınarak lam üzerinde *Staph. aureus* kültürü ile karıştırıldığında "clumping factor" denilen kümeleşme (topaklaşma) meydana gelirse hücre duvarına (partiküle) bağlı koagülaz ile plazma fibrinojeninin reaksiyona girdiği anlaşılır. Tüpte yine tavşan plazması ile yapılan testte hücrelerin serbest koagülaz enzimlerinin etkisiyle plazmanın koagülasyonu gerçekleşir. *Staph. aureus* suşlarının tamamı koagülaz üretmediği gibi *Staph. aureus* dışında başka *Staphylococcus* türlerinin de partiküle bağlı veya serbest koagülaz ürettikleri belirlenmiştir. Bu nedenle hem "clumping factor" hem de tüpte koagülaz testinin birlikte yapılması önerilir. Koagülaz üretimi ile enterotoksin oluşumu arasında çok yüksek bir korelasyon vardır. Buna bağlı olarak asıl önemli olan, koagülaz pozitif *Staph. aureus* varlığının veya sayısının belirlenmesidir. Ulusal ve uluslararası nitelikte pek çok standartta koagülaz pozitif *Staph. aureus* kontrolü yapılır. Baird-Parker agar besiyerine yumurta sarısı emülsiyonu yerine doğrudan tavşan kanı plazması katılarak da analiz yapılmaktadır (Rabbit plasma fibrinogen agar, ISO 6888-2).

-Lesitinaz aktivitesi: *Staph. aureus* suşları genellikle fosfolipaz C (= lesitinaz) aktivitesi gösterirler. Buna bağlı olarak yumurta sarısı emülsiyonu katılan besiyerlerinde tanımlanması sağlanır. Ürettikleri lesitinaz, besiyerinde yumurta

sarısı emülsiyonunda bulunan lesitini hidrolize ederek koloni etrafında berrak bir zon oluşmasını sağlar. Koagülaz negatif olan *Staph. epidermidis* suşlarının fosfolipaz C oluşturma yetenekleri yoktur ve yumurta sarısı emülsiyonu katılmış besiyerlerinde zonsuz olarak gelişirler. Ancak böyle besiyerlerinde zonsuz atipik koloni oluşturan *Staph. aureus* suşlarının da geliştiği saptanmıştır. Süt ürünlerinde atipik *Staph. aureus* suşlarına sıklıkla rastlanmaktadır.

-Termonükleaz: *Staph. aureus* intoksikasyonlarında şüpheli gıdada kültürel yöntemle *Staph. aureus*'un belirlenmesi ve toksinin gösterilmesi beraberce yapılmalıdır. Toksinin belirlenemediği durumlarda koagülaz pozitif *Staph. aureus* suşlarının gıdadaki sayısı önemli olmaktadır. Bununla beraber asitliğin fazla geliştiği veya hafif bir ısıl işlem uygulanmış gıdalarda önceden çoğalmış ve toksin oluşturmuş *Staph. aureus* suşları ölmüş olabilir ve ortamdaki varlıkları ya hiç belirlenemez veya çok daha düşük sayıda belirlenir. Ortamda *Staph. aureus* belirlenememesi, gıdada toksin olmadığını göstermez. Gıdada termonükleaz varlığının gösterilmesi, orada stafilokokların en az 10^5 KOB/g düzeyine çıktığını gösterir. Termonükleaz varlığı stafilokok varlığını kanıtlar, ancak termonükleaz ile enterotoksin oluşumu arasında ilişki yoktur. Diğer bazı bakterilerin de termonükleaz oluşturabilecekleri gözden kaçırılmamalıdır.

Patojenitesi

SEler, pepsin veya tripsin gibi çoğu proteolitik enzimlere direnç gösterir ve bu şekilde alınımdan sonra sindirim kanalında etkinliklerine devam ederler. Ayrıca kimotripsin, renin ve papaine direnç gösterebilirler. Stafilokok enterotoksinleri ısıya da oldukça dayanıklıdır. SE aktivitesi, SE tipi ve konsantrasyonu ile gıda çeşidine bağlı olduğu için ısıl işlemin bu aktivite üzerindeki etkisini öngörmek oldukça zordur. Bu veriler birlikte ele alındığında SE'lerin onları üreten bakterileri kolayca yok eden koşullara (ısıl işlem, düşük pH) dirençli olduğu anlaşılmaktadır.

Stafilokok gıda zehirlenmesinin belirtileri mide krampları, mide bulantısı ve kusma olup bunları bazen ishal de takip etmektedir. İshal, tek başına görülmez. Bitkinlik, terleme, hatta vücut sıcaklığının düşüşü de gözlenebilir. A tipi, en etkili toksindir ve kusturucu dozu çok düşük olup, sadece 1 mg'dır. Hatta 0,1-0,2 mg alınması bile intoksikasyona neden olabilir. Japonya'da 2000 yılı çoklu zehirlenme vakasındaki salgında hastalananların 20-200 ng toksin aldığı tahmin edilmektedir. B toksini için bu doz 20-25 mg'dır.

Staph. aureus kaynaklı intoksikasyon tipi hastalık, dünya çapında en yaygın olarak görülen gastroenteritislerden birisidir. Gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar içinde stafilokokal intoksikasyon payının ülkelere göre değişmek üzere %15-40 olduğu tahmin edilmektedir.

Staphylococcus cinsi içinde insanlarda gastroenteritise neden olan enterotoksin üretme potansiyelinde olan başka türler varsa da (koagülaz negatif *Staph. haemolyticus*, *Staph. epidermis*, *Staph. xylosus*, *Staph. cohnii*), hastalık hemen tümüyle *Staph. aureus* tarafından oluşturulur.

SEler, pirojenik toksin (pyrogenic toxin PT) olarak adlandırılan geniş bir gruba girerler. *Streptococcus pyogenes* de aynı gruba ait olmak üzere stafilokokal enterotoksin benzeri bir toksin oluşturur. Koagülaz pozitif *Staph. intermedius* da gıdadan izole edilen baskın bir türdür ve bazı suşlarının SE ürettiği de ortaya konulmuştur. *Staph. intermedius*, stafilokok gıda zehirlenmesi salgınlarında rol alan *Staph. aureus* olmayan tek türdür.

Staph. aureus intoksikasyonlarının görülmesi için bu bakterinin gıda üzerinde çoğalarak hücre sayısını 10^5-10^6 KOB/g-mL düzeyine veya üzerine çıkarması gerekir. Bu sayıya eriştiğinde gıda üzerinde zehirlenmeye neden olabilecek dozda toksin üretilmiş olur. Bunun dışında stafilokok enteritleri, süt çocuklarında sadece gıdada bulunan enterotoksinin vücuda alınmasıyla değil, *Cl. botulinum*'da olduğu gibi bakteri enfeksiyonu ile de kendini göstermektedir.

Staph. aureus intoksikasyonlarında ölüm çok nadirdir. Kayıtlara geçmiş olduğu şekli ile hastalananların %0,03'ünde ölüm görülmüştür.

İntoksikasyona Aracı Olan Gıdalar

Stafilokok gıda zehirlenmesinde en sık rol alan gıdalar ülkeden ülkeye büyük ölçüde farklılık gösterir. Bu durum, muhtemelen her ülkedeki tüketim ve yemek alışkanlıklarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Örneğin, Fransa'da çiğ süt peynirlerinin tüketimi diğer Avrupa ülkelerindekinden daha yüksektir ve Fransa'da stafilokok gıda zehirlenmelerinde süt ürünlerinin nispeten daha yüksek oranda olması buna bağlanabilir.

Et ürünleri, etli yemekler ve özellikle jambon, kümes hayvanları, başta peynir olmak üzere süt ürünleri, balık ve kabuklu deniz ürünleri, sosis ve sosisli börek, çeşitli salatalar, dondurma ve pastacılık kremaları, sütlaç vb. tatlılar stafilokok zehirlenmelerine neden olmuştur. Bu gıdaların ortak yanı çoğunlukla pişirilmiş, elle hazırlanan ve tüketime kadar buzdolabında muhafaza edilmiş olmalarıdır. Nerede olursa olsun vakalarda ana kontaminasyon kaynağı insanlardır. Gıdayla uğraşan kişiler, doğrudan temas ya da solunum yoluyla, öksürme ve hapşırmayla, gıdaları kontamine etmektedir. Asıl kontaminasyon genellikle gıdaların ısıl işleminden sonra olmaktadır. Bununla birlikte çiğ et, sosis, çiğ süt ve çiğ süt peyniri gibi gıdalarda hayvan kökenli kontaminasyon daha sık görülmekte ve hayvanların taşıyıcılığı ya da enfeksiyonları (örneğin mastitis) nedeniyle meydana gelmektedir.

Stafilokok gıda zehirlenmesinin tüm vakalarında gıda maddeleri ya da bileşenlerinden biri, SE üreten bir *Staph. aureus* suşuyla bulaşmış ve en azından bir süre *Staph. aureus* gelişimine izin veren sıcaklıklara maruz kalmıştır. Bir çoklu zehirlenme vakasında pastörizasyon sonrası ve laktik starter kültürü ile inokülasyon öncesinde kontamine olmuş sütten üretilen peynir sorumlu bulunmuştur. Bu vakada starter kültür düzgün şekilde gelişmemiş ve *Staph. aureus* suşunun gelişmesine ve SE'yi üretmesine bir anlamda "izin vermiştir".

Bir başka çoklu zehirlenme vakasında ise çikolata yapımında kullanılacak süt, pastörizasyon öncesinde kontamine olmuş ve 4-5 saat boyunca oda sıcaklığında depolanmıştır. Pastörizasyon, stafilokokları öldürmüş, ancak SEler üzerinde bir etkiye sahip olmamıştır. Bunun gibi pek çok örnek, gıda ve gıda bileşenlerinin işlenmesi ve soğutulması sırasında tüm kontaminasyon kaynaklarının mümkün olduğunca ortadan kaldırılmasının önemini göstermektedir.

Tarihsel süreç içinde *Staph. aureus* ile ilgili en büyük çoklu zehirlenme vakası, Haziran-Temmuz 2000 tarihinde Japonya'da üretilen süttozuna bağlı olarak ortaya çıkmış ve bu vakada, toplam 13.420 kişinin etkilendiği kayıtlara geçmiştir.

Toksin Testleri

Gıdalarda koagülaz pozitif *Staph. aureus* varlığı ya da 10^5-10^6 KOB/g(mL) düzeyinde sayısı belirlense dahi bu bulgu, gıdanın mutlaka stafilokokal intoksikasyona neden olacağı anlamına gelmez. Bakteri varlığı ile toksin salgılama arasındaki ilişki, en azından gıdanın bileşimi ve başta sıcaklık olmak üzere korunduğu ortam koşullarına bağlıdır ve bakteri gelişmiş olsa dahi toksin oluşturmamış olabilir.

Tersine ve çok daha önemli olarak analiz edilen gıdada koagülaz pozitif *Staph. aureus*'a rastlanmamış olması, bu gıdanın stafilokokal toksinler açısından tehlikeli olmadığını göstermez. Örneğin, *Staph. aureus*, gıdada gelişmiş, toksin salgılamış, daha sonra ısıtma ile öldürülmüş olabilir. Bakteri, ısıl işleme dayanıksızdır, ancak toksinleri biyolojik stabilitelerini 100 ^oC'ta 30 dk ısıl işlem uygulamasında koruyabilmektedirler. Bu durumda asıl önemli olanın toksin testleri olduğu anlaşılmaktadır.

Ancak sadece toksin testi yaparak gıdanın güvenli olduğuna karar verilemez. Toksin testi, sadece gıda tüketilmeden çok kısa bir süre içinde yapılırsa anlamlıdır. Aksi halde gıdada bulunan *Staph. aureus*, gelişerek toksin oluşturabilir.

Uluslararası pek çok standartta gıda güvenliği açısından doğrudan *Staph. aureus* analizi yapılması yeterlidir. Toksin testi sadece şüpheli gıdada yapılır. Bunun nedeni, bu testlerin analiz maliyetlerinin rutin analizlerde kullanılamayacak kadar yüksek olmasıdır.

2011 yılı sonunda (29 Aralık 2011) yenilenen "Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği", tüketime hazır çeşitli gıdalarda dahi belirli sayılarda koagülaz pozitif *Staph. aureus* bulunmasına izin vermektedir. Gıdaların analizinde koagülaz negatif *Staph. aureus* kolonileri dikkate alınmaz.

Staph. aureus analizi 14.14. bölümde verilmiştir.

09.16. *Campylobacter jejuni*

Tanımı

Campylobacteraceae üyesidir. Gram negatif, spor oluşturmayan, ince ve kıvrık çubuk şeklinde tek veya iki uçtaki polar flagellalar ile hareketli bakteriler olup katalaz ve oksidaz pozitiftir. Genç hücreler tirbuşon görünümünde kıvrık iken yaşlı hücreler sferik ya da kokoid şekildedirler. Enleri 0,2-0,5 μm ve boyları 0,5-5 μm'dir. Boyları 8 μm'ye kadar çıkabilir. Pek çok karbohidratı kullanamazlar.

Daha öncesinde sığır ve koyunlarda yavru atmaya neden olan bakteri olarak biliniyorken ilk kez 1977 yılında insanlarda hastalık yaptığı belirlenmiştir.

Campylobacter cinsi içinde 2017 yılı kayıtlarına göre 26 tür ve 9 alt tür bulunmaktadır. *Camp. jejuni* ve *Camp. coli* gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olur. Kampilobakteriyozis[35] vakalarının %80'inden *Camp. jejuni* sorumludur. Bu oran *Camp. coli* için %18,6 olarak tahmin edilmektedir. Çeşitli vakalarda nadiren *Camp. lari* ve *Camp. upsaliensis* de izole edilmiştir.

Camp. jejuni, bugün kayıtlara geçmiş en fazla sayıda enfeksiyon etmenidir. Tüm dünyada ishalli hastalıkların %8,4'ünün etmeni olduğu tahmin edilmektedir.

Ekolojisi

Campylobacter türleri yabani ve evcil hayvanların, özellikle kuşların bağırsaklarında yaygın olarak bulunur. *Camp. jejuni*, sağlıklı hayvanların bağırsak sisteminde doğal olarak bulunan bir bakteridir. *Camp. jejuni* ve *Camp. lari* en çok insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunur. Sığırlarda, domuzlarda, koyunlarda, kanatlılarda, çiğ sütte, deniz ürünlerinde, sebze ve meyvelerde sıklıkla görülürler. Termotrof özellikteki bakteriye vücut sıcaklığının yüksek olması nedeniyle en fazla kanatlılarda rastlanır. Doğal ortamları olan bağırsaktan çevreye atıldığında uzun süre canlı kalamaz.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve İndirgenmesi

Gelişme istekleri dikkate alındığında zor gelişen mikroorganizma olarak değerlendirilir. Çevresel stres koşullarına duyarlıdır. Ortamda normal atmosferik oksijenin bulunması, kurutma, dondurma, ısıl işlem, dezenfeksiyon ve asit koşullar, bu bakterinin gelişmesini olumsuz etkiler hatta ölümüne neden olur. Donmuş olarak -20 ^{o}C'ta 5 hafta canlılığını koruyabilmekle beraber bu süre oda sıcaklığında birkaç güne düşmektedir.

Camp. jeuni, tipik mikroaerofilik (kapneik) karakterde bir bakteri olup gelişmesi için %5 O_2, %10 CO_2 ve %85 N_2 ortamı gerekir. Laboratuvar analizlerinde bu atmosfer ortamı kolaylıkla sağlansa dahi gıda ortamında böyle bir atmosferik bileşimin sağlanması her zaman mümkün değildir.

[35] Kampilobakteriyozis, *Campylobacter* spp'nin neden olduğu hastalık.

Atmosferin bileşimi %78 azot, %21 oksijen ve %1 diğer tüm gazlar şeklindedir. En azından refakatçi floradaki aerop ve fakültatif aeroplar, oksijeni tüketip ortamdaki CO_2 miktarını artırsalar dahi, azot derişimini artırmaları mümkün değildir. Buna bağlı olarak kapneik mikroorganizmalar için asıl önemli olan gelişme ortamında düşük oksijen konsantrasyonudur. Haşlanmış etlerde oksijen, *Camp. jejuni* gelişmesi için yeterince düşük derişime iner. %5-10 O_2 ve %5-10 CO_2 varlığında iyi bir şekilde gelişebilir.

Optimum gelişme sıcaklığı, kanatlı hayvanların vücut sıcaklığı olan 42 ^oC'tır, ancak kimi kaynaklar optimum gelişme sıcaklığını 37-42 ^oC, kimi kaynaklar ise 30-45 ^oC olarak vermektedir. Nitekim insan vücut sıcaklığında rahatlıkla gelişir. 30 ^oC altında gelişemez. 32 ^oC'ta ikiye bölünme süresi 6 saat olarak saptanmıştır. Buna göre oda sıcaklığında (20-25 ^oC) sayısını artırması mümkün değildir, ancak daha önce gelişmiş olanlar oda sıcaklığında canlılıklarını kısmen de olsa sürdürürler.

Optimum 6,5-7,5 olmak üzere gelişebildikleri en düşük pH 4,9'dur. 9,5 pH üzerinde gelişemezler. Gelişebildikleri en düşük su aktivitesi a_s 0,987'dir.

D_{55} değeri yaklaşık 1 dk ve z değeri 5 ^oC'tır. Buna göre yeterince pişirilmiş veya ısıtılmış gıdalarda canlı kalma şansı yoktur. Dezenfektanlara karşı dirençsizdir. Gama radyasyonuna duyarlıdır.

Camp. jejuni, gıda kaynaklı patojenler içinde olumsuz çevre koşullarına en düşük düzeyde direnç gösteren mikroorganizmadır. Buna rağmen günümüzde kayıtlara geçmiş en fazla enfeksiyon etmeni olmasının nedenleri basitçe hijyen yetersizliği, yetersiz pişirme, çiğ süt ve çiğ et kaynaklı gıdaların tüketimi ve minimal enfeksiyon dozunun düşük olması şeklinde açıklanmaktadır.

Patojenitesi

Kampilobakteriyozis, sıklıkla *Campylobacter* enteritisi ya da *Campylobacter* gastroenteritisi olarak bilinir. Patojenik olan suşların patojenik olmayanlardan ayrılması oldukça zordur. Kümes hayvanlarından izole edilen birçok *Camp. jejuni* izolatının patojen olduğu belirlenmiştir.

Camp. jejuni enfeksiyonu, fekal lökosit ve kan içeren sulu veya mukozlu diyareye neden olur. Hastalığın diğer belirtileri arasında ise ateş, karın ağrısı, mide bulantısı, baş ve kas ağrıları yer almaktadır. Hastalık, genel olarak kontamine gıda veya suyun tüketiminden yaklaşık 2-5 gün sonra ortaya çıkar ve ortalama olarak 10 gün sürer. Bakterinin antibiyotiklere duyarlılığı tartışılmaktadır.

Camp. jejuni suşlarının enfeksiyon dozu çok düşüktür. Bazı bireylerde hastalığa neden olan bakteri sayısının yaklaşık 400-500 adet olduğu, diğer bireylerde ise daha yüksek sayıda mikroorganizma alınması gerektiği ortaya konulmuştur. Buna karşın başka kaynaklar, minimal enfeksiyon dozunun 10^3-10^5 arasında olduğunu belirtmektedir. Gönüllüler üzerinde yürütülen çalışmalar enfeksiyon dozunun diğer patojenlerde de olduğu gibi konakçı

hassasiyetine bağlı olduğunu göstermiştir. Genellikle nadir olmakla beraber enfeksiyon, artritis (artrit) ve hemolitik üremik sendrom şeklinde komplikasyonlar görülür ve bu belirtileri septisemi izler. *Camp. jejuni* enfeksiyonlarında ölüm/ vaka sayısı oranı yaklaşık % 0,1'dir. Sağlıklı bireylerde ölüm nadir olarak gerçekleşir ve kanser gibi hastalıklar nedeni ile bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde görülür. Ayrıca sadece 20 vakada çocuk düşürme olayına rastlanmıştır. Menenjit, akut kolesistit, Guillain-Barré sendromu ve Miller Fisher sendromu, nadir karşılaşılan komplikasyonlar arasındadır. Guillain-Barré sendromu, bazı kişilerde periferik sinir sisteminin hasarına bağlı olarak ortaya çıkan ve felce kadar gidebilen kas zayıflamasıdır. 5 yaş altındaki çocuklar ve 15-29 yaşındaki erişkinler enfeksiyondan diğer yaş gruplarına göre daha fazla etkilenmektedir. Miller Fisher sendromu göz kaslarının zayıflamasıdır.

Camp. jejuni suşlarının neden olduğu hastalık diyare, bazen kanlı dışkı, kusma ve ateşle kendini gösterir. Hastalığa neden olan suşların enterotoksin, sitotoksin ve adhezyonu olanaklı kılan adhesin oluşturdukları saptanmıştır. Kişiden kişiye bulaşma nadirdir.

Sadece mezofilik *Camp. fetus* invazivdir. *Camp. jejuni* gibi optimum gelişme sıcaklıkları 42 ºC olan termofilik türleri bazen invaziv özellik gösterebilmektedir.

Hastalığa Aracı Olan Gıdalar

ABD ve Avrupa ülkelerinde sağlıklı insanlarda bulunmadığı halde sıklıkla sağlıklı sığır, kümes hayvanları ve kuşlar ile ayrıca nehir gibi klorlanmamış su kaynaklarından da izole edilmiştir.

ABD'de yılda 2-4 milyon *Camp. jejuni* kaynaklı vaka sayısının *Salmonella* vakalarından daha yüksek sayıda olduğu tahmin edilmektedir. Yine ABD'de okullarda yapılan bir çalışmada *Camp. jejuni* varlığının *Salmonella*'dan 10 kat ve *Shigella*'dan 46 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

İnsanlarda tipik gastroenterit yanında geçici asemptomatik olarak insanlar taşıyıcı durumda da bulunabilirler. Bu durum, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygındır. Arıtılmamış kanalizasyon aracılığıyla kontamine olmuş gıda ve su tüketiminin oluşturduğu hastalıkların %70 kadarının *Campylobacter* kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir. Pastörize edilmemiş süt, et, kümes hayvanları, kabuklu deniz ürünleri, meyve ve sebzeler, bu gıdaların en tipik örnekleridir.

Kampilobakteriyozis vakaları genellikle küçük salgınlar olarak ortaya çıkar. Bununla beraber Benington'da (İngiltere) olduğu gibi klorlanmamış suyun neden olduğu ve 2000 kişiyi hastalandıran salgınlara da rastlanmıştır. Birkaç küçük salgına ise okul çocuklarına verilmiş olan sütün neden olduğu belirlenmiştir. Bunlara karşın geniş çaplı tarama çalışmaları, yeterli pişirilmemiş veya tekrar kontamine olmuş piliç etlerinin enfeksiyonların %50'sinden fazlasına neden olduğunu göstermiştir.

ABD'de 1013 kişinin etkilendiği 20 salgının nedeni çiğ süt tüketimi olarak saptanmıştır. Çiftlik ve evcil hayvanlardan doğrudan insanlara bulaşma ise oldukça yüksek düzeydedir. Yapılan araştırmalar sonunda kümes hayvanlarının %20-100 arasında değişen oranlarda *Camp. jejuni* ile kontamine olduğunun saptanması doğal bir sonuç olarak karşılanmaktadır. Nadiren de olsa çiftlik hayvanlarının dışkıları ile kontamine olan su kaynakları ve özellikle kuyu suyu enfeksiyon kaynakları arasında yer almaktadır. *Camp. jejuni* analizi 14.15. bölümde verilmiştir.

09.17. Vibrio parahaemolyticus

Tanımı

Vibrionaceae familyası içerisinde yer alan *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* ve *V. vulnificus*, insanlarda patojendir. Bunlardan *V. cholerae*, kolera etmeni olup asıl olarak kontamine yüzey ve içme suları aracılığı ile ölümcül salgınlara neden olur. *V. vulnificus*, insanlarda kusma ve ishallere neden olur. Bu bakterinin yaptığı hastalık, nadiren de olsa ölüme neden olur. *V. vulnificus*, sıcak deniz sularında rastlanan halofil karakterli bir bakteridir. Başta çiğ olarak tüketilen istiridye olmak üzere kontamine deniz ürünlerinin tüketilmesi sonucu kusma, ishal ve karın ağrısı şeklinde görülen gıda kaynaklı hastalıklara neden olur. Bağışıklık sistemi zayıflamış olanlar ve özellikle kronik karaciğer hastalığı olanlarda ateş ve titreme ile karakterize olan tansiyon düşmesine (septik şok) neden olabildiği ve *V. vulnificus* septisemisinin %50 ölüme neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca açık yaradan deniz suyu aracılığı ile vücuda girerse önemli deri enfeksiyonlarına yol açabildiği gösterilmiştir.

V. parahaemolyticus, ilk kez 1951 yılında Japonya'da gıda kaynaklı hastalık etmeni olarak tanımlanmıştır. Çiğ su ürünleri tüketiminin çok yaygın olduğu Japonya'da gıda kaynaklı gastrointestinal hastalıkların kimi kaynaklara göre yarısından, kimi kaynaklara göre %24'ünden sorumludur.

Gram negatif, spor oluşturmayan, çubuk veya eğri çubuk şeklinde, monotrik polar flagellaya sahip bir bakteridir. *Photobacterium*'lardan ayrılan en önemli morfolojik özelliği flagella etrafında ince bir zar tabakası oluşturmasıdır. Aerobik veya fakültatif anaerobik olan *V. parahaemolyticus*, oksidaz ve katalaz pozitiftir.

Ekolojisi

V. parahaemolyticus, başta deniz kıyıları olmak üzere nehirlerin denize döküldüğü bölgelerde ve fazla akıntılı olmayan körfez bölgelerinde yaygın olarak bulunur. Nehirlerin getirdiği organik artıklar *Vibrio* spp. için besin maddesi oluşturur. Sıcak ve tuzlu denizlerde daha sık görülür.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve İndirgenmesi

Tuzlu deniz suyu ortamında yaşayan halofilik bir organizma olduğu için %7 gibi yüksek tuz oranında gelişebilir. Optimum gelişimini %2,9-3,1 oranında tuzlu ortamlarda gösterir, bu nedenle saf suda gelişemez. Anaerobik koşullarda da gelişebilmesine rağmen aerop koşullarda daha iyi gelişir. Doğal yaşama ortamında 10 ^{o}C'ın altında gelişemez. Laboratuvar koşullarındaki kuvvetli besin ortamlarında 5-44 ^{o}C'ta çoğalabildiği gözlenmiş olmasına karşın optimum gelişme sıcaklık aralığı 30-35 ^{o}C'tır. Kimi kaynaklar optimum gelişme sıcaklığını 37 ^{o}C olarak vermektedir. Diğer pek çok bakteriden farklı olarak optimum gelişme pH'sı 7,2-7,6 arasındadır. Kimi kaynaklara göre gelişme pH aralığı optimum 7,8-8,6 olmak üzere 4,8-11,0'dır. *V. parahaemolyticus*, laboratuvar şartlarında %3 tuz içeren besiyerinde 30 ^{o}C'ta pH 5,2 gibi oldukça asitli ortamlarda gelişebilir. Gelişebildiği minimum su aktivitesi a_s 0,94'tür. Optimum koşullar sağlandığında *V. parahaemolyticus*'un ikilenme süresi oldukça hızlı olup 9-13 dk olarak ölçülmüştür.

%0,1 asetik asit varlığında gelişemez. Kurumaya çok duyarlıdır ve saf su bu bakteriyi inaktive eder. Isıl işleme direnci düşüktür. D değeri 65 ^{o}C'ta 1 dk'dan daha kısa, 55 ^{o}C'ta 2,5 dk'dır. Işınlamaya çok duyarlıdır. Balıkta D değeri <0,1 kGy olarak saptanmıştır. 13 ppm klora maruz kaldığında D değeri 15 sn olarak saptanmıştır.

Özellikleri

Gıda mikrobiyolojisinde *V. parahaemolyticus*'u diğer tüm bakterilerden ayıran en önemli özellik, bu bakterinin sadece deniz ürünlerinde bulunmasıdır.

Kuzey Amerika ve Avrupa'da az rastlanılmakla birlikte Japonya'da gıda kaynaklı enfeksiyonların önemli bir bölümü *V. parahaemolyticus* kaynaklıdır.

Yapılan çalışmalarda deniz ürünleri dışındaki tüm enfeksiyon vakalarında söz konusu gıdanın *V. parahaemolyticus* içeren deniz ürünü ile çapraz kontaminasyona uğradığı ve bu yolla gastroenteritise yol açtığı kanıtlanmıştır.

Patojenitesi

Hastalanmada en önemli belirtiler ishal, baş ağrısı, karın krampları, kaslarda güçsüzlük hissi ve üşümedir. Hastalık belirtileri genellikle gıdanın tüketiminden 3 ile 76 saat sonrasında ortaya çıkar ve iyileşme 1-8 gün kadar sürer. Diğer enfeksiyon tipi hastalıklardan farklı olarak *V. parahaemolyticus* vakaları, insandan insana bulaşma göstermez. Genellikle 1 hafta içerisinde büyük ölçüde iyileşme görülürken nadir olmakla birlikte bazı vakalarda ölüm görülebilmektedir.

Gıda enfeksiyonlarında *V. parahaemolyticus*'un etki potansiyeli Kanagawa reaksiyonu ile belirlenir. Bu reaksiyonun varlığı, Wagatsuma agar besiyeri içerisine insan kırmızı kan hücreleri ilave edilmesi ve β-hemoliz reaksiyonunun gözlenmesi ile saptanır. Kanagawa pozitif (K^{+}) suşlar zehirlenme vakalarında

etkili olan suşlardır. Bu suşlar ısıya dayanıklı direkt hemolisin adı verilen (thermostable direct hemolysin, TDH) hemolisinleri üretme yeteneğine sahiptir. Kanagawa negatif (K^-) suşlar ise ısıya dayanıklı olmayan hemolisinleri (heat-labile hemolysin, HLH) üretirler. Bazı suşlar her iki hemolisini de üretme yeteneğine sahipken nadiren izole edilen bazı suşlar ise sıcaklığa bağımlı hemolisinler (thermostable-related hemolysins: TRH) denilen üçüncü bir grup hemolisinleri üretme yeteneğine sahiptir. *V. parahaemolyticus* kaynaklı gıda enfeksiyonlarında izole edilen suşların %100'ü, denizlerden izole edilen suşların ise sadece %1'i Kanagawa pozitiftir. Bu bulgular, denizlerden izole edilen suşların büyük bir çoğunluğunun gıda enfeksiyonlarına yol açma olasılığının oldukça zayıf olduğunu göstermektedir. TDH yaklaşık 42.000 dalton büyüklüğünde sitotoksik bir proteindir, ayrıca fareler üzerinde yapılan deneylerde kardiyotoksik etkisinin de olduğu gözlenmiştir. TDH üreten tüm suşların bu toksini sadece pH 5,5-5,6 aralığında üretebildikleri gösterilmiştir. Toksin çalışmalarında belirlenebilen minimum toksinin miktarının ortamdaki hücre sayısı ancak 10^6 KOB/g'a ulaştığında gerçekleştiği ortaya çıkarılmıştır.

Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Hemen tümüyle çiğ yenilen su ürünleridir. Midye, karides, yengeç, ıstakoz ve benzeri deniz kabukluları enfeksiyona neden olan en yaygın etmenlerdir. Bunlar başka gıdaları da kontamine edebilir.

V. parahaemolyticus analizi 14.16. bölümde verilmiştir.

09.18. *Cronobacter sakazakii*

Tanımı

Cronobacter sakazakii, *Enterobacteriaceae* üyesi olup Gram negatif, fakültatif anaerop, çubuk şeklinde, spor oluşturmayan ve peritrik flagellaları ile hareketli bir bakteridir. Bu bakteri önceden, sarı pigment oluşturan bir *Enterobacter cloacae* tipi olarak tanımlanmışken 1980 yılında DNA-DNA hibridizasyonu, biyokimyasal reaksiyonları, pigment üretimi ve antibiyotik duyarlılıklarındaki farklılıklar nedeniyle *Ent. sakazakii* adıyla yeni bir tür olarak tanımlanmıştır.

2007 yılında yapılan taksonomik çalışmalar sonunda *Ent. sakazakii, Enterobacteriaceae* familyası içerisinde *Cronobacter* olarak tanımlanan yeni bir cins altında *Cro. sakazakii* olarak adlandırılmıştır.

Cro. sakazakii, adını her çocuğunu doğar doğmaz yutan Yunan mitolojisi titanı Cronos ve Japon mikrobiyoloğu Riichi Sakazaki'den alır. Bu bakterinin menenjit etmeni olduğuna ilişkin ilk açıklama 1961 yılında yapılmıştır.

Ekolojisi

Doğal yaşam alanı bilinmemekle beraber gıdalardan, çevreden ve farklı klinik kaynaklardan izole edilmiştir. Temel çevresel kaynaklarının su, toprak ve

sebzeler olduğu, ikincil bir kontaminasyon yolunun da sinekler ve kemirgenler gibi vektörler olabileceği belirtilmiştir. Özellikle ahır sineğinin dünyadaki yayılışı ile *Cro. sakazakii* enfeksiyonlarının rapor edildiği bölgeler arasında önemli bir korelasyon olduğu belirtilmektedir.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve İndirgenmesi

Cro. sakazakii, 6-47 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında ve optimum olarak 37-43 ºC'ta gelişebilir. Gelişebilmesi için gereken en düşük pH 3,9-4,1'dir. Süt ürünlerindeki termal direncinin diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir. 60 ºC'ta D değeri 2,5 dk olarak verilirken başka çalışmalarda 58 ºC'taki D değeri 0,48 dk olarak bulunmuştur. Bu değerler arasındaki farkın ısıtma ortamının bileşiminden ve suş farklılıklarından kaynaklandığı açıktır. Bebek mamasındaki yağ, protein ve karbohidrat içeriğinin *Cro. sakazakii*'yi termal inaktivasyondan koruyabileceği, dolayısıyla daha yüksek D değerlerinin elde edileceği gösterilmiştir. Ozmotik ortam ve kurutma gibi stres koşullarına diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine kıyasla daha dirençlidir ve düşük su aktivitesine sahip olan toz bebek mamasında (A_s 0,25-0,5) uzun süre canlılığını koruyabilmektedir. Toz mamada su aktivitesindeki yükselme canlı kalmayı azaltmaktadır. Kuru bebek mamasında 2 yıla kadar canlılığını koruması, bakterinin kapsül oluşturması ile ilişkilendirilmektedir.

Özellikle doğum evlerinin yenidoğan ünitelerinde, bebek maması hazırlanmasında ve bebeklerin beslenmesinde biberon temizliği, aynı biberonun kullanılmaması gibi temel hijyen kuralları geçerlidir. Mama, hazırlandıktan sonra ivedilikle tüketilmelidir.

Patojenitesi

Asıl olarak henüz tam olgunlaşmamış bağırsak yapısına sahip olan prematüre (erken doğmuş), yaşı 28 günden küçük, düşük doğum ağırlığına sahip (<2,5 kg) ve medikal bakım gören bebekler *Cro. sakazakii* enfeksiyonu riski altındadır. Bu hastalık, erginlerde nadiren de olsa tespit edilmiştir. Bebeklerde bakteriyel menenjit, septisemi ve nekrotizan enterokolit etmenidir. Ölüm/ vaka oranı hakkında çelişkili veriler vardır. Kimi kaynaklar bu oranı %19, kimileri ise %40-80 olarak vermektedir. Enfeksiyon sonrası hayatta kalanlar için süregelen sorunların nörolojik rahatsızlıklarla sonuçlanabildiği bildirilmiştir.

Cro. sakazakii, potansiyel olarak yaşamı tehdit eden ya da önemli kronik doku hasarına yol açan ciddi bir tehlike olarak tanımlanmış ve *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tip A ve tip B ve *Cryptosporidium parvum* (su kaynaklı bir protozoon) gibi gıda ya da su kaynaklı patojenler ile aynı grupta yer almasına karar verilmiştir.

Hastalığa Aracı Olan Gıdalar

Cro. sakazakii, serebrospinal sıvılar, kan, kemik iliği, balgam, idrar, bağırsak ve solunum sistemleri, göz, kulak, yaralar ve dışkı dâhil olmak üzere çok geniş

klinik kaynaklardan izole edilmiştir. *Cronobacter* spp.'nin gıdalarda ve çevrede, klinik ortamlarda olduğundan daha yaygın olduğu belirtilmiştir. Bu patojen peynir, süttozu, bebek mamaları, UHT süt, fermente edilmiş hamur, tofu, kürlenmiş et, dana kıyma, sosis eti, tahıllar, baharat ve sebzeler de dâhil olmak üzere bir dizi gıdadan izole edilmiştir. Ayrıca fabrika ortamlarından, süttozu üretim tesislerinden, ev tipi elektrik süpürgesinden de sıklıkla izole edildiği bildirilmiştir. Elde edilen bulgular bakterinin her yerde bulunabilen dağılımını doğrulamaktadır.

Cro. sakazakii analizi 14.17. bölümde verilmiştir.

09.19. *Bacillus cereus*

Tanımı

Bacillus cereus sporlu, Gram pozitif, aerop ve fakültatif anaerop, çubuk formlu bir bakteridir. Logaritmik gelişme evresinin sonunda ya da durma fazında hücreler Gram varyabl özellik gösterebilir. Sporlar santral veya subterminal pozisyonda olup vejetatif hücrenin genişliğinden daha geniş değildir. Bu bakteri çok yaygın olarak hemen her yerde bulunmaktadır. Toprak kökenli olup gerek toz ve toprak ile gerekse su ile yayılım göstermektedir. Adını tahıl (cereal)'dan alır. Peritrik flagellaları sayesinde hareketlidir ancak hareketsiz suşlarına da rastlanmaktadır.

Önceden saprofit olarak tanımlanmışken daha sonra patojen olduğu anlaşılmıştır. İlk kez 1887 yılında ahır havasından izole edilmiştir. 1950 yılında Norveç'te Dr. Steinar Hauge, bu bakterinin insan patojeni olduğunu kanıtlamıştır. 1947-1949 yılları arasında toplam 600 kişinin etkilendiği 4 salgını inceleyen Dr. Hauge, bütün salgınlarda mısır nişastası kullanılarak hazırlanan vanilya sosunda 10^4 *B. cereus* sporu/g olduğunu saptamış ve Koch postülatı çerçevesinde $4x10^6$ KOB/mL *B. cereus* olan kültürden 200 mL içmiştir. 13 saat sonra hastalığın başlaması ile bu bakterinin insan patojeni olduğu kanıtlanmıştır. Bu yıldan sonra Avrupa ülkelerinde *B. cereus*'un neden olduğu, başta et ve sebze çorbaları, pişirilmiş et ve kanatlı etleri, balık, süt ve dondurma olmak üzere gıda kaynaklı pek çok enfeksiyon ve salgın görülmüştür. 1954 yılında ABD'de gönüllüler üzerine yapılan deneme, Dr. Hauge'nin kendi üzerinde yaptığı denemeyi kanıtlamamıştır. Ancak ABD'de 1969'da *B. cereus* kaynaklı olduğu kesinleşen salgın, kayıtlara girmiştir.

Ekolojisi

Toprak kökenli sporlu bakteri olmasına bağlı olarak rüzgâr ile her yere kolaylıkla taşınabilir.

Gelişmesi ve Canlı Kalması

Psikrotrof özelliktedir. Gelişme sıcaklık sınırları 4-50 °C ve optimum olarak 28-35 °C (başka kaynaklara göre 30-40 °C) arasında değişmekle birlikte genellikle 30 °C olarak verilmektedir. Spor germinasyonu (çimlenmesi) için gereken sıcaklık 8-30 °C'tır. Oda sıcaklığında kolaylıkla gelişir ve sporları kolaylıkla çimlenir. Gelişebildiği pH aralığı 4,9-9,3 olup optimum 7,0'dır. Başka kaynaklar, minimum pH değerini 4,4-5,0 olarak vermektedir. Polimiksine dirençlidir. Birçok suşu %7,5 tuzda gelişebilir. Bazı suşların %10 NaCl varlığında gelişebildiği gösterilmiştir. Minimum su aktivitesi A_s 0,91-0,93'tür. Nutrient agar gibi basit bileşimli genel besiyerlerinde kolaylıkla gelişir. Gelişmesi için bazı aminoasitlere gerek duyar ancak vitamin gereksinimi yoktur. Sporlarının 100 °C'ta D değeri yaklaşık 3 dk'dır. Sporları ışınlamaya dirençlidir ve D_{10} 1,25-4,0 kGy olarak verilmektedir. Ancak vejetatif hücreler ışınlamaya duyarlıdır (D_{10} 0,17-0,65 kGy).

Özellikleri

Çiğ sütlere özellikle sağım sırasında bulaşan *B. cereus*, psikrotrof özelliği sayesinde soğutulmuş olsa dahi çiğ sütte gelişebilir ve ekstraselüler (hücre dışına salgılanan) proteolitik enzimler (proteazlar) salgılar. Sütün UHT ile sterilizasyonu sırasında sporlu bakteriler de ölür ama daha önce salgılanan bu enzimler imha olmaz.

UHT sütün depolaması sırasında bu enzimler, süt proteinini parçalayarak sütün bozulmasına neden olur. Benzer şekilde *Pseudomonas* türleri de aynı şekilde UHT sütü bozan proteolitik enzimler salgılarlar. Bu enzimlerin kısa süre içinde belirlenebileceği ve buna göre proteolitik enzim miktarı yüksek olan sütlerin UHT süte değil pastörize süt, yoğurt gibi başka süt ürünlerine işlenmesini sağlayacak test kitleri artık üretilmemektedir. Bu nedenle UHT süte işlenecek çiğ sütler, olabildiğince kısa süre içinde işletmeye getirilip işlenmelidir.

Sporları, epitel hücrelere yapışıp daha sonra çimlenip, toksin üretebilir. *B. cereus* sporları, diğer bütün *Bacillus* türlerine kıyasla daha hidrofobiktir. Gıda işleme ekipmanlarının yüzeyine yapışarak temizlik ve sanitasyon işlemlerine direnç gösterir ve sonrasında gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir.

Patojenitesi

Farklı *B. cereus* biyotipleri, kusturucu (intoksikasyon) ve ishale neden olan (enfeksiyon) olmak üzere birbirlerinden tümüyle farklı 2 farklı toksin üretir.

Bunlardan birisi 40 kDa ağırlığında ve bir protein olan enterotoksindir. Genellikle 12-13 (bazı kaynaklara göre 4-16) saatlik bir inkübasyon süresinden sonra sulu diyareye neden olur, bulantı yapar, ender olarak da kusma görülür. Hastalık genellikle 12-24 saat sürer. Bu hastalık, enfeksiyon tipidir ve ağırlıklı olarak et ürünleri, çorbalar, sebzeler, puding ve sos tüketimine bağlı olarak

genellikle Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde görülür. Hastalığın seyri ve ortaya çıkma süresi, *Cl. perfringens* enfeksiyonu ile çok büyük benzerlik gösterir ve buna bağlı olarak hastalığa hangi patojenin neden olduğunun tahmini çok güçtür. *Cl. perfringens* enfeksiyonundan farklı olarak *B. cereus* enfeksiyonu, sporlanma ile ilişkili değildir. Hastalık, farklı kaynaklara göre 10^3-10^7 KOB canlı bakterinin vücuda girmesi ile ortaya çıkar.

Diğeri ise emetik (kusturucu) toksin olarak tanımlanan 5-7 kDa ağırlığında olan bir peptittir. 2-5 saat gibi daha kısa bir inkübasyon süresinden sonra ağırlıklı olarak bulantı ve kusma ile kendini belli eder. Diyare seyrek olarak görülür. Toksinlerin, bakterinin logaritmik gelişme evresinin sonlarına doğru üretildiği belirlenmiştir. Bu hastalık intoksikasyon tipidir ve pirinç içeren gıda tüketimine bağlı olarak daha çok Japonya'da görülür. Hastalığın seyri ve ortaya çıkma süresi, *Staph. aureus* intoksikasyonu ile çok büyük benzerlik gösterir ve buna bağlı olarak hastalığa hangi patojenin neden olduğunun tahmini zordur. *Staph. aureus* intoksikasyonundan kısmen farklı olarak pirinç yemeklerinde sıklıkla görülür. *B. cereus* toksininin gıda üzerinde salgılanarak hastalığa neden olması için en az 10^5 KOB/g bakteri olması gerekmektedir.

Gıda kaynaklı hastalıklara ilaveten *B. cereus*, solunum sistemi ve yara enfeksiyonlarına neden olabilir.

Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Sporlu olması ve rüzgârla taşınabilmesine bağlı olarak *B. cereus*, tüm gıda hammaddelerinde görülebilir. Yetersiz pişirme ya da pişirme sonrası çapraz bulaşmalar (kontaminasyonlar), pişirme sonrası yeterince hızlı bir şekilde soğutulmamış tüm gıdalar *B. cereus* kaynaklı hastalıklar açısından risklidir.

B. cereus analizi 14.18. bölümde verilmiştir.

09.20. *Shigella* spp.

Tanımı

İlk olarak 1896 yılında[36] Japon mikrobiyolog Kiyoshi Shiga tarafından dizanteri etmeni olarak izole edilmiş ve *Bacillus dysenteries* olarak adlandırılmıştır. 1950 yılında *Shigella* cinsi tanımlanmış ve somatik O antijenlerine dayanan 4 serogruba ayrılmıştır. 2017 yılı kaynaklarına göre bunlar *Shigella dysenteriae* (serogrup A; 15 serotip), *Shigella flexneri* (serogrup B; 8 serotip), *Shigella boydii* (serogrup C; 19 serotip) ve *Shigella sonnei* (serogrup D; 1 serotip) şeklindedir.

Enterobacteriaceae üyesidir ve familyanın tipik özellikleri olan Gram negatif, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, oksidaz negatif ve birkaç *S. dysenteriae* serotipi hariç olmak üzere katalaz pozitif karakter gösterir.

[36] Farklı kaynaklar, bu tarihi birkaç yıl farkla vermektedir.

Laktoz negatif (birkaç suş hariç), sitrat ve H_2S negatif reaksiyon gösterirler. Birkaç istisnanın dışında karbohidratları gaz oluşturmaksızın fermente etme özelliğine sahiptirler. DNA homolojilerine göre *Escherichia* türleri ile *Shigella* türleri %70-100 ilişkilidir. Kimi kaynaklar bu iki bakterinin klasik yöntemlerle ayrımının çok zor olduğunu bildirirler. Oysa *E. coli* ile *Shigella* spp. en azından basit bir şekilde laktoz testi ile kesin olarak ayırt edilebilir[37]. *E. coli* laktoz pozitif, *Shigella* spp. laktoz negatiftir (bknz ⇒ 06.04.03.10. Karbohidrat Testleri).

ABD'de her yıl 14000 shigellosis vakası bildirilmektedir. Birçok hafif vakanın teşhis veya rapor edilmemesi nedeniyle enfeksiyonların gerçek sayısının yirmi kat daha fazla olabildiği tahmin edilmektedir. Yaz mevsiminde kış aylarına göre daha fazla shigellosis vakası görülür. Özellikle 2-4 yaş arasındaki çocuklarda yaygındır.

Ekolojisi

Basilli dizanteri olarak da bilinen shigellosise neden olan *Shigella* cinsi bakterilerin doğal florası insanların ve bazı maymunların bağırsak sistemleridir. Diğer memeli hayvanların bağırsak sistemlerinde rastlanmamıştır. Bu cinse dâhil olan türler, direkt dışkı bulaşması ile ya da dışkı bulaşmış gıdalar ve sular aracılığı ile yayılmaktadır. Özellikle kişisel hijyen koşullarına dikkat edilmeden üretilmiş gıdalar, hastalığın yayılmasında en önemli etken durumundadır. İnsandan insana bulaşma da yaygındır.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve İndirgenmesi

Shigella spp., gıda maddelerinde çok uzun süre canlılıklarını muhafaza edebilirler ve kısa süreli olarak düşük pH'lı ortamları tolere edebilirler. Gelişme için sıcaklık optimum 37 ºC, en düşük 10 ºC ve en yüksek 40 ºC'tır. Bununla birlikte *Shigella sonnei* analizinde 44 ºC'ta zenginleştirme yapılmaktadır.

55 ºC'ta 1 saatlik ısı uygulaması ile ölürler. 4,5 pH altında canlı kalamaz. NaCl toleransları %5-6'dır.

Özellikleri

Basilli dizanteri, özellikle gelişmekte olan ülkelerde en fazla hastalığa yol açan etmenlerden birisidir.

Shigellosise yakalanan kişide hastalığa neden olan serotipe karşı birkaç yıl süren bir bağışıklık olur. Ancak başka bir serotip bu süre içinde hastalığa neden olabilir.

[37] *Shigella sonnei* laktozu 40 saat sonra fermente edebilir (geç laktoz pozitif). Oysa bu süre, *E. coli* için 24 saattir. *E. coli* serotipleri içinde de geç laktoz pozitifler vardır.

Patojenitesi

Shigellosis vakalarında enfeksiyon dozu 10^1 ile 10^4 hücre/ insan arasında değişir. *Shigella* spp.'nin neden olduğu gastrointestinal enfeksiyonlar genellikle karın ağrısı ve krampları, ishal nedeniyle aşırı su kaybı ve bağırsaklarda ülser benzeri ağrılar şeklinde ortaya çıkar. Bazen kanlı ishal görülür. Belirtilerin ortaya çıkma süresi 12 saat ile 50 saat arasında değişmekle birlikte bazı durumlarda tipik olarak 4 gün sürmekte, nadiren 10-14 güne kadar uzadığı da bilinmektedir. İçlerinde özellikle *Sh. dysenteriae* çok az sayıda canlı hücre ile hastalığa neden olur. 10-100 hücre alınmasıyla şiddetli karın ağrısı, ateş, kanlı ve mukoit diyare ile karakterize olan basilli dizanteri baş gösterir.

Shigella türlerinin virülens etkisi, enfeksiyona neden olan suşların bağırsak mukozasını aşarak (invaziv etki) epitel hücrelere yerleşmesi ile meydana gelir. Virülens suşların 120-140 megadalton büyüklüğünde bir plazmit taşıdıkları ve invaziv etkiye neden olan genlerin bu plazmitte kodlu olduğu belirlenmiştir. Virülens etki aynı zamanda sıcaklığa bağlı olarak değişir. Düşük sıcaklıkta (örneğin 30 ^oC'ta) geliştirilen hücrelerde invaziv etki görülmezken 37 ^oC'ta gelişen hücrelerde görülür. Bunun nedeni virülens etkiden sorumlu olan plazmidin kaybedilmesi değil, sadece ekspresyonunun engellenmesidir. 30 ^oC'ta geliştirilen hücreler, sıcaklık 37 ^oC'a yükseltildiğinde 2-3 saat içinde tekrar virülens etki gösterebilir. Bu nedenle virülent plazmide sahip *Shigella* ile kontamine olmuş gıda maddelerinin düşük sıcaklıklarda korunması, riski ortadan kaldırmaz. Çünkü mide bağırsak sisteminde *Shigella* tekrar virülens özellik kazanır. Shigellosise neden olan Shiga toksin, sitotoksik özellikte olup etki mekanizması, memelilerde protein sentezinin engellenmesine neden olmasıdır. Shiga toksin biyosentez genleri genomda bulunur.

Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Bu gıdalar başlıca piliç eti, balık eti veya diğer deniz ürünlerini içeren salatalar, çiğ olarak tüketilen sebzeler, çiğ kıyma, midye ve diğer deniz ürünleridir. Uygun koşullarda üretilmeyen içme suları özellikle gelişmekte olan ülkelerde shigellosisin yayılmasının başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir.

Kontaminasyon, özellikle sıcak ülkelerde gıdaların ve suların insan dışkısı ile kirlenmesi sonucunda ortaya çıkar. İnsandan insana bulaştığı, gıdalarla da taşınabildiği, ancak gıdaların bu bakterilerin çoğalmasına olanak tanımadığı ve sadece vektör (taşıyıcı) olarak rol aldığı bilinmektedir.

Sh. sonnei, gıdalara bulaşan ve en sıklıkla rastlanan türdür. Çiğ kıymada ve istiridyede rastlanır. Kanalizasyon sularının karıştığı sular aracılığıyla yayılırlar. Bulaşmada en büyük etken su kaynaklarıdır.

Shigella spp. analizi 14.19. bölümde verilmiştir.

09.21. *Yersinia enterocolitica*

Tanımı

Enterobacteriaceae üyesi olan *Yersinia enterocolitica*, Gram negatif, oksidaz negatif, sporsuz ve fakültatif anaerobik bir bakteridir. Genç kültürler mikroskopta kokobasil şeklinde görülür, yaşlanma ile birlikte çubuk şekline dönüşürler.

Yersinia cinsi içinde 2017 yılı verilerine göre 17 tür bulunmaktadır. Bunlardan *Y. enterocolitica, Y. pestis* ve *Y. pseudotuberculosis* insanlar için primer patojen iken diğerleri fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilirler. *Y. enterocolitica*, bu 3 tür içinde en önemlisi olup ilk kez 1930'lu yıllarda insan patojeni olarak saptanmıştır ve bugün için yaygın bir intestinal patojen olarak kabul edilen türdür. Neden olduğu gastroenterit, yersinyozis olarak adlandırılır. *Y. pestis* bubonik ve pnomonik plak (veba, kara ölüm) etmenidir. *Y. pseudotuberculosis* ise kemirgenler için intestinal patojendir ve insanları nadiren enfekte eder. Japonya'da *Y. pseudotuberculosis* ile kontamine olmuş su ve gıdalar insanlarda enfeksiyona neden olmuştur. Diğer çoğu patojenden farklı olarak kış mevsiminde daha etkili olur.

Ekolojisi

Y. pestis ve *Y. pseudotuberculosis* sıkça domuz, kuş, kunduz, kedi ve köpeklerden izole edilir. *Y. enterocolitica* ise ekosistemde yaygın olarak bulunmakta ve dolayısıyla toprak, göller, hayvanlar ve çeşitli gıdalardan izole edilmektedir. Normal koşullarda *Y. enterocolitica* pastörizasyon işlemine duyarlı olmakla birlikte birçok ülkede pastörize sütlerden izole edilmiştir. Bu bakteri, memeli hayvanların yanı sıra kanatlılar, kurbağa, balık, sinek gibi pek çok hayvanın bağırsak sisteminde de bulunur. Bu denli yaygın bir ekosistemde bulunması nedeni ile dolaylı olarak pek çok gıdada rastlanılması doğaldır.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve İndirgenmesi

Psikrotrofik karakterli olup 0-44 °C gibi çok geniş bir sıcaklık aralığında ve optimum olarak 28-30 ºC'ta gelişir. Kimi kaynaklar gelişme sıcaklık aralığını daha düşük olarak -1,3-42 ºC olarak vermektedir. 4-10 (optimum 7,6) gibi oldukça geniş bir pH aralığında gelişir. Gelişebileceği minimum su aktivitesi A_s 0,96'dır. %5 konsantrasyondaki NaCl'e direnç gösterebilir. Fenotipik özellikleri, sıcaklığa bağlı olarak değişiklik gösterir ve 25-29 °C'ta daha karakteristik sonuçlar alınır. Bu yüzden biyokimyasal testleri bu sıcaklıklarda yapılır. 25 °C'ta peritrik flagellalı ve hareketli olan *Y. enterocolitica* hücreleri 37 °C'ta hareketsizdir.

Isıl işleme duyarlıdır. $D_{55°C}$ ~2 dk, $D_{60°C}$ ~0,5 dk ve $D_{65°C}$ ~2 sn'dir. %7 NaCl ortamında gelişemez, %9 NaCl öldürücüdür. İyonize ve UV radyasyon uygulamalarına, sodyum nitrat ve nitrite çok duyarlıdır. Su ortamında 1,4-1,9 ppm ozon gazı varlığında 1 dk içinde canlılıkta 4,6-6,2 log KOB/mL azalma olur.

5 ppm ozonlu suda 1 dk bekletme ile patates yüzeyinde1,6 log KOB/g azalma görülmüştür.

Patojenitesi

Yaptığı hastalık akut gastroenteritistir. Bu hastalıktan çocuklar daha fazla etkilenirler. Küçük çocuklarda ve gençlerde diyare, ateş ve karın ağrısı görülür. Her yaştan insanda ortaya çıkan hastalıkta karın ağrısı ile birlikte mide ağrısı, sulu ve bazen kanlı diyare tipik belirtilerdir. *Y. pseudotuberculosis*'te diyare genellikle görülmez, karın ve mide ağrısı ile başlayan rahatsızlık daha sonra romatizma benzeri artritlere, gençlerde ve çocuklarda bağ dokusu ve lenf düğümü yangılarına neden olur.

Hastalık, daha fazla ılıman-serin kuşakta bulunan ve domuz eti tüketimi yüksek olan Amerika ve Avrupa ülkelerinde görülür. Domuzlarda ve çevrede çok yaygın olan bakteri domuz eti, domuz dili ve bunlarla hazırlanan yiyeceklerde bulunur. ABD'de en önemli yersinyozis kaynağının yeterli ısıl işlem görmemiş domuz ürünleri olduğu bildirilmiştir. *Y. pseudotuberculosis*'in doğal habitatı ise daha geniştir. Av hayvanlarında, evcil hayvanlarda ve çiftlik hayvanlarında bulunur. Direkt temas yolu ile veya gıda ve sular aracılığıyla taşınır.

Y. enterocolitica enfeksiyonlarına özellikle 7 yaşından küçük erkek çocuklarında kız çocuklarına ve yetişkinlere oranla daha sık rastlanır. Bazı kaynaklarda cinsiyet ayrımı yapılmadan 5 yaş altındaki çocuklarda daha sık görüldüğü belirtilmektedir. Yersinyozis, çoğu defa hafif bir ateş ve mide ağrısı ile beraber diyare ve/veya kusma ile kendini belli eder. Ayrıca apandisit benzeri karın krampları ve yüksek ateş de belirleyici semptomlardır. Dışkı, suludan mukoide kadar değişkenlik gösterir, %10'dan daha az hastada bariz kanlı dışkı görülür. Genelde hastalık, kontamine gıdanın tüketiminden 24-48 saat sonra ortaya çıkar. Ancak bu süre 11 güne kadar da uzayabilmektedir. Enfeksiyon karakteristik olarak birkaç günde sona ermekle beraber 3-4 haftaya, hatta kronik enterokolit durumunda birkaç aya kadar uzayabilir. Nadiren akut enteritis, ülsere dönüşebilir. Hastalık antibiyotik tedavisine gerek kalmadan geçmektedir.

Hastalığın ortaya çıkmasında serotipler önemlidir. Bilinen 60 kadar serotip içinde O:3, O:8, O:9 ve O:5,27, insanlarda hastalığa neden olanlar arasında en önemli olanlardır. ABD'de her yıl 117.000 hastalanma ve 35 ölüm tahmin edilmektedir.

Enfeksiyona Aracı olan Gıdalar

Y. enterocolitica'nın sık olarak izole edildiği gıdalar arasında çiğ etler, süt, süttozu, dondurma, peynirler, krema, çiğ sebzeler, yetersiz arıtılmış su, balık ve istiridyeler bulunmaktadır. Ayrıca bakteri nadiren pastane ürünleri, yumurta, sosis ve pişmiş gıdalardan da izole edilmiştir.

Y. enterocolitica analizi 14.20. bölümde verilmiştir.

09.22. Enterokoklar

Tanımı

Öncesinde *Streptococcus* cinsi içinde yer alan ve Lancefield serolojik gruplandırmasına göre D grubu streptokokların bir kısmı, yapılan DNA analizleri sonunda 1984 yılında *Enterococcus* cinsi altına alınmıştır. Fekal streptokoklar olarak da anılmaktadır. Bu cins altında çok sayıda tür bulunmakla birlikte *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium*, gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren en önemli 2 türdür. Gram pozitif, mikroskopta ikili ya da kısa zincir şeklinde kok görüntülü ve fakültatif anaerop olup spor oluşturmazlar. *Enterococcaceae* üyeleridir.

Ekolojisi

Doğada çok yaygındır. Doğal florası memeli hayvanların, kuşların ve sürüngenlerin bağırsak sistemidir. Dışkı ile çevreye ve gıdalara bulaşır. Buna bağlı olarak toprak, bitkiler ve çevresel su numunelerinden kolaylıkla izole edilebilir. Toksin üretmediği kesin olarak belirlenmiş biyotipleri, peynir üretiminde starter kültür olarak, hatta insanlarda probiyotik olarak kullanılmaktadır. Dolayısı ile gıda ya da çevresel bir numunede enterokok varlığının fekal bulaş (kontaminasyon) göstergesi olup olmadığı tartışma konusudur. Ancak içme ve kullanma sularında enterokoklara rastlanması doğrudan fekal kontaminasyon olarak değerlendirilir.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve İndirgenmesi

Optimum gelişme sıcaklığı 35-37 ºC olup 10-45 ºC arasında, 4,5-10,0 pH arasında ve %6,5 NaCl varlığında gelişebilir. 60 ºC'ta 30 dk ısıl işleme ve dezenfektanlara direnç gösterdiği belirtilmiştir. Enterokokların ısıl işleme ve dezenfektanlara direncinin tür farklılığından daha fazla olarak suş ölçüsünde olduğu ve cins içinde büyük farklar olduğu bildirilmiştir. 30 ppm sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk sürede canlılıkta önemli azalma sağlanmaktadır.

Özellikleri

İçme ve kullanma suları ile yüzme havuzu sularında fekal kontaminasyon göstergesi olarak fekal koliformlardan daha fazla önem taşımaktadır. Bunun nedeni, *E. coli* ve diğer koliform bakterilere göre çevresel olumsuzluklara daha dirençli olmasıdır.

Gıdalardan ve özellikle süt ürünleri ile peynirlerden izole edilmiş olan bazı *Ent. faecium*, *Ent. faecalis* ve *Ent. durans* suşları endüstriyel ölçekte peynir starter kültürü olarak kullanılmaktadır. Türk tipi Beyaz peynir için laktokoklar yanında enterokok türlerinden birinin bulunması önerilmektedir. Ayrıca Cheddar peyniri, yumuşak İtalyan peynirleri ve bazı İsviçre peynirlerinin yapımında asit, tat ve aroma oluşumu için kullanılmaktadır.

Süt ürünlerinde starter olarak kullanılan enterokok suşlarının temel özelliği, biyojen amin oluşturmamalarıdır.

Patojenitesi

Sindirim yolu ile vücuda giren enterokokların patojenitesi kanıtlanamamıştır. Bunların biyojen amin oluşumuna neden olarak hastalanmalara yol açabileceği iddia edilmekle beraber özellikle peynirde kontaminant olarak bulunan diğer bakterilerin çok daha fazla biyojen amin oluşturabileceği ya da sinerjik etkileri konusunda farklı görüşler vardır. Peynirlerde starter kültür olarak kullanılan enterokokların biyojen amin oluşturma güçleri yoktur ya da önemsiz düzeydedir. Genel olarak fırsatçı patojen olarak kabul edilirler. Gönüllüler üzerinde yapılan testlerde 10^6-10^9 KOB/kişi düzeyinde herhangi bir hastalık belirtisi görülmemiştir. Bazı suşlarının enteritise neden olduğu saptanmıştır. Mide bulantısı, karın ağrısı, kusma ve ishal görülebilir.

Enterokokların gıda kaynaklı hastalık oluşturmaları tartışma konusu olmakla birlikte klinik mikrobiyoloji açısından idrar yolları enfeksiyonu, bakteremia (bakterinin kana geçmesi), bakteriyel endokarditis, divertikül (bağırsak duvarının dışa keseleşmesi) ve menenjit gibi hastalıklara neden olduğu için önemli bir bakteridir. Hastane enfeksiyonlarına yol açar.

Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Çeşitli et ve süt ürünlerinde biyojen amin oluşturan serotipler potansiyel olarak hastalık yapabilir.

Enterokok analizi 14.21. bölümde verilmiştir.

09.23. *Pseudomonas* spp.

Tanımı

Pseudomonadaceae üyesidir. Gram negatif, spor oluşturmayan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Mikroskopta kısa zincirler şeklinde görülürler. Hareketli ve hareketsiz türleri vardır. Tümü katalaz pozitif ve aerop karakterlidir. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren *Pse. aeruginosa*, hareketli bir türdür. İnsanlarda ve hayvanlarda patojen türleri vardır.

Ekolojisi

Çok zengin enzim sistemlerine sahip oldukları için doğada her yerde bulunabilirler ve canlılıklarını sürdürebilirler. İnsanlar ve hayvanlar tarafından kirletilen su kaynaklarından, hastanelerin lavabolarından ve yüzme havuzlarından sıklıkla izole edilebilirler.

Gelişmesi, Canlı Kalması ve İndirgenmesi

Aerop karakterli olmakla birlikte gelişme ortamında nitrat ya da başka bir elektron akseptörü bulunursa anaerop koşullarda da gelişebilir. 25-42 °C arasında optimum gelişme gösterir. *Pse. aeruginosa*, 42 °C'ta gelişebilmesi ile diğer *Pseudomonas* türlerinden kolaylıkla ayrılabilir. Optimum 6,6-7,0 olmak üzere 5,6-8,0 pH aralığında gelişebilirler. pH'sı 3 olan dezenfektanlarla 60 sn'de indirgenirler.

Özellikleri

Antibiyotiklere yüksek direnç gösterir ve buna bağlı olarak hastane enfeksiyonlarında önemli rol oynar. Gıda mikrobiyolojisine kıyasla klinik mikrobiyolojiyi ilgilendiren bir bakteridir. *Pse. aeruginosa*, gıda mikrobiyolojisini sadece içme ve kullanma sularının mikrobiyolojik analizi konusunda ilgilendirir. Analizinde sıklıkla *Pse. fluorescens* ile karıştırılır. İnsani tüketim amaçlı sularda 250 mL suda *Pse. aeruginosa* olmaması gerekmektedir.

Pse. aeruginosa, soğutulmuş çiğ sütlerde proteaz enzimi üretir. Bu enzim, UHT süt üretimi sırasında aktivitesini korur ve zamanla enzimatik olarak sütün pıhtılaşmasına neden olur. Aynı durum, *B. cereus* için de geçerlidir (bknz⇒ 09.19. bölüm).

Patojenitesi

İnsanlarda iltihaplı yaralar başta olmak üzere pek çok hastalığa neden olurlar. Septisemi koşulunda ölüm görülebilir. Oportunistik gıda patojeni olarak tanımlanır. Gıdaları bozulmasında çürükçül olarak rol alır.

Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Pek çok gıdada rastlanılabilir. Belirli bir gıda grubu tanımlanmamıştır. Süt ve ürünlerinden, kırmızı ve beyaz etlerden, su ürünlerinden, meyve ve sebzelerden izole edilmiştir.

Pse. aeruginosa analizi 14.22. bölümde verilmiştir.

09.24. Diğer Saprofitler

Gıda maddelerinde toplam mezofil aerop ve toplam mezofil anaerop bakteri grupları dışında üzerinde önemle durulması gereken saprofit bakteri grupları vardır.

Bu kitap, gıdalardaki tüm saprofitleri açıklayan bir ansiklopedi değildir. Bu kitapta sadece gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren yaygın saprofitler yazılmıştır. Örneğin, bitkisel hammaddede bozulmaya neden olan *Erwinia carotovora*, tümüyle bu kitabın içeriği dışındadır.

Saprofit *Bacillus* Türleri

Bacillus cinsi, 260'dan fazla tür içerir ve bakterilerin en karmaşık cinslerinden birisidir. Çubuk şeklinde, spor oluşturan, büyük çoğunluğu Gram pozitif ve aeroptur. Gram varyabl (değişken) türleri olduğu gibi fakültatif anaerop olan türleri de vardır. *Bacillus* türlerinin çok büyük çoğunluğu saprofit olmakla beraber *B. anthracis* gibi insan sağlığını çok yakından ilgilendiren türler de vardır. Bu cinsin üyelerinin büyük çoğunluğu mezofil karakterlidir ancak psikrotrof, termotolerant ve optimum gelişme sıcaklığı 50 °C üzerinde olan termofilik türler de bulunur. Mikroskopta tek, ikili ya da uzun zincir şeklide görülebilirler. Toprak kökenlidirler. *Bacillus* türlerine sporların rüzgârla kolaylıkla taşınması nedeni ile her yerde rastlamak mümkündür.

Isıl işlem eksikliğine/ yetersizliğine bağlı olarak gıdalarda *Bacillus* türlerinin sporları canlı kalabilir ve ortam koşulları uygun olduğunda bu sporlar çimlenerek gıdada bozulmaya neden olabilir. Ayrıca buzdolabında korunan çiğ etlerde de bozulmalara yol açarlar.

Gıdalarda bozulma etmeni olarak en yaygın görülen *Bacillus* türleri pastörize sütte, çiğ ette, et ürünlerinde, soslarda, puding gibi şekerli ürünlerde bozulmalara neden olanlar, konserve gıdalarda görülen düz ekşime etmeni olanlar ile başta ekmek olmak üzere tahıl ürünlerinde görülen sünme etmeni olanlardır.

Pek çok *Bacillus* türü proteazlar, lipazlar ve amilazlar gibi ticari enzimlerin üretiminde kullanılır. Ancak bu enzimlerin bir kısmı ısıl işleme dirençlidir ve bakteri ölse dahi enzim aktivitesi devam eder ve gıda bozulur.

Gıdalarda bozulmaya neden olan *Bacillus* türlerinin başında *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* (syn. *B. mesentericus*), *B. megaterium*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*[38] ve *B. coaugulans* gelir.

Çoğu *Bacillus* türü, özellikle konserve gıdalarda karbohidratları fermente ederken gaz oluşturmaz ve dolayısıyla gıda ekşir ancak bombaj görülmez. Bu bozulma türü "düz ekşime" olarak tanımlanır. Düz ekşimeye en çok neden olan türler *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* olarak saptanmıştır.

Ekşi hamurdan yapılan ekmeklerde "sünme (rop)" hastalığı olarak tanımlanan bozulmaya asıl olarak *B. subtilis* neden olur. *B. licheniformis* ve *B. pumilus* da etken olarak saptanmıştır. Sünme hastalığı, bakterilerin amilaz aktivitesine bağlı olarak ekmekte istenmeyen kavun kokusu, renk bozukluğu ve sünmeye neden olur.

---

[38] Günümüzde *Geobacillus stearothermophilus* adıyla anılmaktadır. Isıl işleme en dirençli bakterilerden birisi olup 121 °C'ta D değeri 1,5-2,0 dk'dır. Otoklavda sterilizasyon etkinliğinin testi için kullanılır (bknz ⇒ 05.07. bölüm)

Salça üretiminde uygulanan ısıl işlem, tüm sporlu basillerin öldürülmesine yetmez ve ısıya en dirençli olan sporlar canlı kalabilirler. Salçanın asitliği ve kurumaddesi, raf ömrü boyunca bu sporların çimlenerek ürünün bozulmasını önemli ölçüde baskılar. Bu nedenle salça fabrikalarındaki mikrobiyolojik analizlerde sporlu aerop bakteri (asıl olarak *Bacillus* spp.) görülmesi, çok büyük bir tehlike işareti değildir. Çünkü mikrobiyolojik analizin yapıldığı besiyeri pH'sı nötrdür ve bakterinin gelişmesi için temel engel olan yüksek asitlik ile anaerop koşullar ortadan kalkmıştır. Ancak ısıl işlemde canlı kalmış ya da ısıl işlem sonrası dolum sırasında bulaşmış, aside dirençli fakültatif anaerop basillerin salçada gelişip ürünü bozma potansiyeli göz ardı edilemez.

Dolayısıyla salçanın toplam mezofil aerop bakteri analizi sırasında Petri kutusunda görülen basil görünümlü koloniler izole edilmeli, salça pH'sına ayarlanmış genel bir katı besiyerine sürülüp anaerop ortamda inkübe edilmelidir. İnkübasyon sonunda gelişme olursa ciddi tehlike vardır.

Saprofit basil türleri için genel besiyerleri kullanılır.

Saprofit *Clostridium* Türleri

Yaklaşık 150 türü vardır. Gelişmelerinin erken evrelerinde Gram pozitif reaksiyon verirler, ancak yaşlı kültürlerde Gram negatif reaksiyon da görülmektedir. Anaerop, spor oluşturan, mikroskopta çubuk ya da hafifçe kıvrık şekilde görülen bakterilerdir. Çoğu katalaz negatiftir. *Cl. perfringens* gibi bazı türler aerotoleranttır.

Asıl olarak toprak kökenli olmakla beraber sporları rüzgâr ile her yere taşınır ve dolayısıyla kanalizasyon, deniz sedimentleri, bitki ve hayvan ürünleri ile insanların ve hayvanların sindirim sitemlerinden sıklıkla izole edilebilir. Sporları, çevresel ortamlarda yıllarca canlılıklarını sürdürebilirler.

Isıya dirençli sporları, ısıl işlem görmüş gıdalarda bozulmalara neden olurlar. *Bacillus* spp.'den farklı olarak karbohidratları gaz oluşturarak fermente ederler ve konserve gıdalarda bombaja neden olurlar. Böylece bombaj yapmış gıda konservesinin bozulmuş olduğu kolaylıkla anlaşılır. Bombaj, ısıl işlem görmemiş gıdalarda *Clostridium* türleri dışında başka bakteriler/ mayalar tarafından da oluşturulabilir.

Sebze konserveleri dışında başka *Clostridium* türleri de çeşitli gıdalarda gelişerek ekonomik kayıplara yol açar. Bunun en tipik örneği, peynirlerde "geç şişme" olarak tanımlanan gıda bozulmalarıdır ve asıl olarak pastörizasyona dirençli *Cl. tyrobutyricum* ve *Cl. butyricum* tarafından gerçekleştirilir. Peynire işlenecek sütte bu bakterilerin analizi 2-5 gün sürer. Bu süre içinde negatif sonuç alınması koşulunda sütün peynire işlenmesine izin verilmesinin beklenmesi, teknik ve ekonomik açıdan mümkün değildir. Dolayısı ile işletmeye gelen süt, bekletilmeksizin peynire işlenir. Analizler sonunda peynirde geç şişme etmeni *Clostridium* saptanırsa peynir işletmesi, pazarlama konusunda hızlı karar vermek zorundadır.

Başta *Cl. tyrobutyricum* ve *Cl. butyricum* olmak üzere çeşitli *Clostridium* türleri, vakum altında paketlenmiş taze kaşar peynirlerinde de gaz delikleri ve şişmeye neden olmaktadır. Bu bakteriler çok genel olarak silajdan süte bulaşırlar.

Sadece peynirde geç şişme değil, meyve, sebze ve et konserveleri ile peynirlerde ve diğer gıdalarda bozulmaya yol açan başka *Clostridium* türleri de vardır. *Cl. sporogenes*, *Cl. nigrificans* (syn. *Desulfotomaculum nigrificans*), *Cl. pasteurianum*, *Cl. estertheticum*, *Cl. laramiense*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. cochlearium* ve *Cl. thermosaccharolyticum* çeşitli gıdalarda bozulma etmeni olarak izole edilen en yaygın *Clostridium* türleri arasındadır.

Saprofit *Clostridium* spp. analizi genel anaerop besiyerlerinde yapılır. Peynirde geç şişme etmeni *Clostridium* spp. analizi 14.24.01. bölümde verilmiştir.

Laktik Asit Bakterileri

Gram pozitif, cinslere göre çubuk ya da kok şeklinde bakterilerdir. Çok farklı cins ve türdeki laktik asit bakterileri gıdalarda bozulmaya neden olurlar. *Sporolactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmazlar. Homofermantatif ya da heterofermantatif metabolizmaya sahiptirler. Pek çok tür, insanlarda ve hayvanlarda patojen değildir, hatta özellikle bağırsak mikroflorası için yararlı özelliklere sahiptir. Beta hemolitik streptokoklar, insanlarda hastalığa neden olur. Fermente süt ürünleri üretiminde kullanılmakla beraber diş tedavisi gibi uygulamalarda doğrudan kana karışırsa septisemiye yol açan laktik asit bakterileri olduğu bildirilmiştir.

Laktik asit bakterileri başlıca *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinslerinden oluşur. Fermente et, süt ve sebzelerin üretiminde kullanılan pek çok tür vardır. Kulanım amacı dışında gıdalara bulaştıklarında istenmeyen bozulmalara neden olurlar. Örneğin *Lac. plantarum*, turşu fermantasyonunda önemli bir bakteri iken pek çok gıdanın bozulmasında rol oynar. Özellikle dolum aşamasında salçaya bulaşan laktik asit bakterileri bombaj yaparak önemli ekonomik kayıplara neden olurlar.

Bu çerçevede laktik asit bakteri türlerini yararlı ve zararlı olarak gruplandırmak mümkün değildir. Her ne kadar cins ismi Lacto (süt), kelimesinden gelse de bitkilerden izole edilen bazı *Lactobacillus* türlerinin sütte gelişemediği görülmüştür.

Fermente süt ürünlerinde kullanılanlar da dâhil olmak üzere tüm laktik asit bakterilerinin analizi 14.24.02. bölümde verilmiştir.

Diğer Saprofitler

Gıdalarda bu üç grup dışında pek çok saprofit bakteri olduğu açıktır. Bu kitapta, tüm saprofitlerin verilmesi planlanmamıştır. Ekonomik önemi nedeni ile *Alicyclobacillus* analizi, 14.24.03. bölümde verilmiştir. *Alicyclobacillus* spp.,

elma suyu konsantrelerinde bulunduğunda son üründe petrol kokusu oluşturarak kalite kaybına neden olur.

Lipolitik özelliğe sahip mikroorganizmaların bazı peynirlerde aroma oluşturmaları nedeni ile belirli sayılarda bulunmaları istenirken başka peynirlerde ve diğer gıdalarda bulunmaları istenmez. Aynı durum proteolitik karakterli mikroorganizmalar için de geçerlidir.

09.25. Diğer Patojenler

Bu bölümde, nadir olarak görülen gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojen bakteriler verilmiştir. Bunların büyük bir bölümü fırsatçı (oportünist) patojen olup genellikle salgınlara yol açamazlar, bireysel hastalıklara neden olurlar.

Patojenik *Bacillus* spp.

Bacillus cinsinin üyeleri olan *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. pumilus*, gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Yaptıkları hastalıklar hakkında primer patojenlerin neden oldukları hastalıklara kıyasla daha az bilgi vardır. Bu bakteriler, gıdada başka patojen bulunmazsa ve sayı 10^5 KOB/ g(mL)'den daha fazla ise hastalık nedeni olarak atanırlar. Hastalık, bakterinin gıdada gelişmesi ve toksin salgılaması ile ilişkilidir. Bu durumda intoksikasyon şeklinde hastalanma olmaktadır.

B. subtilis, obligat aerop olmasına rağmen ortamda nitratlar ya da glikoz varsa anaerop ortamda da gelişebilir. Yüksek ısıl işleme dayanıklıdır. Patojen olup olmadığı tartışma konusudur. Çoğu kaynak bu bakterinin patojen olmadığını belirtir. Hastalık, gıdanın tüketiminden 10 dk ile 14 saat arasında ortaya çıkar ve semptomlar 1,5-8,0 saat içinde biter. Tipik olarak bildirilen semptomlar kusma ve diyaredir. Karın krampları daha az görülür. Olağandışı semptomlar bulantı, kızarıklık, terleme ve baş ağrısıdır. Gıda zehirlenmesi ile ilişkili suşlardan, ısıya dayanıklı bir sitotoksin olan amilozin tespit edilmiştir. Amilozin, gıda kaynaklı hastalıklara bağlı *B. mojavensis* suşlarında da tespit edilmiştir.

B. subtilis, bir başka virülens faktörü olan subtilisin enzimini üretir. Bu enzim, yüksek miktarlarda tüketildiğinde alerjik reaksiyonlara neden olabilir. *B. subtilis* ile ilişkilendirilen tipik gıdalar etli hamur ürünleri, etli pirinç, deniz ürünleri, diğer et ürünleri ve bebek mamalarıdır.

B. licheniformis kaynaklı gıda zehirlenmesi, tüketimden 2-14 saat sonra görülür ve semptomlar 6-24 saatte son bulur. Tipik semptomlar kusma, diyare ve karın kramplarıdır. Toksik bileşen lichenysin olarak saptanmıştır. Lichenysin, ısı, proteaz, asit ve alkole dirençlidir. Dolayısıyla, önceden salgılanmış birçok toksin gibi pişirme veya konakçının sindirim sistemi tarafından tahrip edilemez. *B. licheniformis* ile ilişkilendirilen tipik gıdalar, *B. subtilis*'te olduğu gibi etli hamur işleri, pirinç veya diğer sebzelerdir.

B. pumilus zehirlenmesi de yine 15 dk ile 11 saat arasında hızlı bir şekilde başlar, ancak hastalık birkaç gün sürebilir. Tipik semptomlar kusma ve baş dönmesi, ardından karın ağrısıdır.

Aeromonas spp.

Aeromonas türleri, Gram negatif, aerobik ve çubuk şeklindeki bakterilerdir. Optimum 28 ^{o}C olmak üzere 0-45 ^{o}C arasında gelişebilirler. 4-5 ^{o}C'ta ikilenme süresi 9-14 saattir. *Aeromonas* türleri aside çok duyarlıdır ve 6,0 pH altında gelişemezler, ancak alkali ortama daha fazla tolerans gösterirler. Klor gibi dezenfektanlara duyarlı olmalarına rağmen doğal su kaynaklarında, ev lavabolarında ve kanalizasyon suyunda 10^{8} KOB/mL düzeyinde saptanmıştır. İnsan ve hayvanların dışkılarında geçici bir süre bulunabilir. Genellikle insan bağırsak florasının bir parçası olarak görülmez. Dışkıda bulunma oranı, tropik bölgelerde (%30) ılıman bölgelerden (%3) daha yüksektir. Etten kolayca izole edilir. Çiğ süt, kümes hayvanları, balık, kabuklu deniz hayvanları ve sebzeler *Aeromonas* spp. içerebilir.

Bu cins, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere göre iki ana gruba ayrılır. Bunlardan birincisi hareketsiz ve balıkta hastalık yapan psikrofilik gruptur. *Aer. salmonicida* bu grubun tipik türüdür. Diğeri ise hareketli ve mezofil olan gruptur. *Aer. hydrophila*, *Aer. caviae* ve *Aer. veronii* biovar *sobria* türleri bu gruptadır. Bu 3 bakteri insanlarda patojenite gösterebilmektedir. *Aer. hydrophila*, gıda kaynaklı hastalıklarla en belirgin şekilde ilişkilendirilmiştir. Oportunistik patojendir ve sağlıklı insanlarda nadiren enfeksiyona neden olur.

Aeromonas analizi 14.24.05. bölümde verilmiştir.

Plesiomonas shigelloides

Önceden *Aeromonas shigelloides* olarak bilinen *Ples. shigelloides* Gram pozitif, fakültatif anaerop, oksidaz pozitif, çubuk şeklinde bakterilerdir. Toprakta ve suda bulunur. Tür ismini, pek çok suşun başta *Shigella sonnei* olmak üzere *Shigella* türleri ile antijenik olarak çapraz reaksiyon vermesinden alır. Tropikal ve subtropikal bölgelerdeki tatlı su kaynakları ve nehir ağızlarında görülür. Ilıman bölgelerde hava sıcaklığının artması ile *Ples. shigelloides* sayısı da artar. Deniz sularında bulunmaz. Balıklar, kabuklular, suda yaşayan diğer hayvanlar ile su kuşlarından sıklıkla izole edilebilir. Suda yaşamayan sürüngenler, kedi ve köpekte hastalık yaptığı saptanmıştır.

Optimum 35-39 ^{o}C olmak üzere 8-45 ^{o}C arasında gelişir.

Ples. shigelloides, insanlardaki gastroenterit, septisemi, selülit, artrit, kolesistit, osteomyelit ve menenjit gibi bir dizi enfeksiyon ile ilişkilendirilmiştir. Genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde hastalığa neden olan fırsatçı bir patojen olarak düşünülür, ancak bağışıklık sistemi baskılanmamış kişilerde de bazı vakalar bildirilmiştir.

Gastroenterit, sulu ishal ve karın ağrısı tipik semptomlardır. Bu semptomlar, canlı bakterinin vücuda girmesinden sonraki 24 saat ile 7 gün arasında görülür. Hastalığın ikinci en yaygın biçimi olan enfektif kolit, akut dizanteri benzeri bir hastalıktır. Dışkıdaki kan ve mukus, belirgin karın ağrısı ve kusma, ağır vakalarda ateş görülür. 2 ay süren kronik ishale neden olduğu gösterilmiştir. Ölüm, nadirdir.

Su, en yaygın bulaşma kaynağıdır. Turist ishallerine neden olduğu bildirilmiştir. Başta istiridye olmak üzere çiğ balık ve kabuklu deniz hayvanları ve deniz ürünleri hastalıkta rol alır. Çiğ balık tüketimi yaygın olan Japonya'da enfeksiyon prevalansı daha yüksektir.

Clostridium difficile

Cl. difficile, *Clostridium* cinsinin karakteristik özelliklerine sahip Gram pozitif, anaerobik, spor oluşturan ve çubuk şeklinde bir bakteridir.

Et, kabuklular ve sebzelerden izole edilebilir. *Cl. perfringens* gibi bağırsakta gelişir ve ishale yol açan toksinler üretir. Başka hastalıklar nedeniyle antibiyotik kullanımına bağlı olarak bağırsak florası bozulmuş kişilerde yaygındır. Sporları, hastane ortamında kolayca yayılarak "uzun dönem bakım ünitelerinde" salgınlara yol açabilmektedir. Sporları ısıl işleme ve kurumaya dirençlidir. Temel virülens determinantları toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin)'dir. *Cl. difficile* enfeksiyon tanısı, dışkı örneklerinde *Cl. difficile* toksin A ve/veya toksin B'nin tespit edilmesine dayanmaktadır.

ABD'de, çiğ sığır eti, domuz eti ve hindi eti örneklerinin %41-44'ü ile hazır sosislerin %14-63 oranlarında toksikolojik *Cl. difficile* içerdiği bildirilmiştir. Buna karşın çiğ kıyma numunelerinde Avrupa'da %4,3 ve Kanada'da %12 pozitif sonuç bildirilmiştir.

Klinik mikrobiyolojide *Cl. difficile* enfeksiyonunun tedavisi için yoğun antibiyotik kullanımı sonunda bozulan bağırsak florasının yenilenmesi için fekal transplantasyon uygulamasının başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir.

Arcobacter spp.

Arcobacter türleri *Campylobacteriaceae* üyeleridir ve *Campylobacter* cinsiyle birçok özelliği paylaşmaktadır. Mikroaerofil, Gram negatif, hareketli ve spiral biçimli çubuklardır. *Campylobacter* spp.'den daha fazla aerotolerant olmaları ve aerobik olarak da gelişebilmeleri, optimum 30 ºC ve minimum 15 ºC'ta gelişebilmeleri ile ayrılmaktadırlar.

Arcobacter türleri arasında *Arc. butzleri*, *Arc. skirrowii* ve *Arc. cryaerophilus*, akut diyare ve karın ağrısı olan hastalardan izole edilmiştir. Sulu ishal, birkaç hafta sürebilir. Özellikle çiğ piliç olmak üzere çeşitli etler, *Arcobacter* türlerinin kaynağıdır. Az pişmiş et tüketiminin potansiyel olarak gıda kaynaklı hastalıklara yol açabileceği gösterilmiştir.

10. MİKOTOKSİNLER

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

10.01. Genel Bilgiler **405**
10.02. Mikotoksinlerin Tarihçesi **407**
10.03. Hammaddenin Miktoksijenik Küflerle Bulaşması **408**
10.04. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyon Yolları **409**
10.05. Mikotoksinlerin Canlılara Etkileri **410**
10.06. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler **411**
10.07. Aflatoksin **413**
10.08. Fumonisinler **417**
10.09. Okratoksin **418**
10.10. Trikotesenler **419**
10.11. Diğer Mikotoksinler **420**

10.01. Genel Bilgiler

Küf ve mantar deyimlerindeki kargaşalık yabancı dillerde de vardır. Aynı canlı türüne klinik mikrobiyologlar mantar derken diğer gruplar küf adını vermektedir. Aslında mayalar ve şapkalı mantarların da içinde bulunduğu âlem, adını şapkalı mantarlardan alır. Kavram kargaşasından kurtulmak için makrofungus (şapkalı mantarlar), flamentli mikrofungus (küfler) ve flamentsiz mikrofungus (maya) olarak da tanımlanabilirler. Genel olarak insan ve hayvanlarda başta deri hastalıkları olmak üzere hastalık yapanlar için "mantar", gıdalarla ilişkilendirilenler için ise "küf" deyimi kullanılmaktadır. "Küf mantarı" deyişi anlamsız olsa da çeşitli mikrobiyoloji disiplinlerinde kullanılmaktadır.

Yaklaşık 100 bin fungus türünün tanımlanmış ve sınıflaması yapılmış olmakla beraber yeryüzünde 1,5-5,0 milyon farklı fungus türü olduğu ve bunların ancak %5 kadarının bilindiği tahmin edilmektedir. İnsanlar, hayvanlar ve bitkilerde ölüme kadar giden çok sayıda hastalığa neden olmalarına karşın penisilin ve diğer antibiyotiklerin, çeşitli endüstriyel enzimlerin ve kimyasalların üretiminde, küflü peynir yapımında ve daha pek çok uygulamada küflerden yararlanılır.

Fungi âleminin sınıflandırılması üzerine günümüzde çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bugün için tüm mikologlar tarafından kabul görmüş bir sınıflandırma yoktur. Genetik esaslı analizlere dayanılarak ileride sınıflandırmanın daha da kesinleşeceği açıktır.

Gıda mikrobiyolojisi açısından gıdanın belirli bir sayıdan fazla küf içermesi kalite ve hijyen eksikliği olarak kabul edilir. Asıl önemli olan ise mikotoksinlerdir. Mikotoksin üreten en önemli olanlar *Deuteromycota* (Fungi imperfecti) sınıfındaki *Aspergillus, Penicillium, Alternaria* ve *Fusarium* cinslerine giren türlerdir.

Tarımsal ürünler hasat öncesi, hasat ve hasat sonrası küflerle kontamine olurlar. Küflerle kontaminasyon, mikotoksin oluşma tehlikesine ilave olarak ekonomik kayıplara neden olur. Yemlerin küflerle kontamine olması da aynı problemleri getirir. Mikotoksin oluşmasa dahi küflenmiş yem ile beslenen hayvanlarda beslenme eksiği olur.

Mikotoksinler, sindirim yolu ile ya da soluma ile veya deriden emilme yoluyla vücuda girdiklerinde insanlarda ve kümes hayvanları dâhil olmak üzere hayvanlarda performans kaybı, çeşitli hastalıklar ve ölüme neden fungal metabolitler olarak tanımlanmaktadır.

Mikotoksin üreten (mikotoksijenik) küf sayısı bugün yaklaşık 350 kadardır. Bugüne kadar 400 mikotoksin tanımlanmıştır, ancak mikotoksin sayısı sürekli artmaktadır. 2017 yılı kaynaklarına göre 500'den fazla mikotoksin vardır. Kimi kaynaklar, mikotoksijenik küf türünün ancak 100-150 kadar ve mikotoksin sayısının 300'den biraz fazla olduğunu, mikotoksijenik küf sayısı ve mikotoksin sayısının daha yüksek olarak bildirilmesinin tanımlama hatası olduğunu belirtmektedir. Mikotoksin sayısındaki artışa mikotoksinler üzerinde yürütülen yoğun çalışmaların yanı sıra yeni antibiyotik ve kemoterapik ajanların arandığı çeşitli laboratuvarlarda bazı metabolitlerin mikotoksin olarak tanımlanmasının da katkısı olmuştur. Örneğin okratoksin A (OTA) bu şekilde bulunmuştur. Nefrotoksik etkiye sahip OTA'nın Balkan nefropatisi ile olan ilişkisi daha sonraki yıllarda anlaşılmıştır.

Funguslar, antibiyotikler ve mikotoksinler gibi çeşitli sekonder metabolitleri üretirler. Bu sekonder metabolitlerin bazıları mikroorganizmaların gelişmelerini engeller (antibiyotik). Örneğin patulin, öncesinde antibiyotik olarak kabul edilmiştir ve üzerinde bu şekilde çalışılmıştır. Genelde mikroorganizmalara etkili olanlar antibiyotik, yüksek organizmalara toksik etki gösterenler mikotoksin olarak tanımlanır. Ancak çok geniş anlamda mikotoksinleri fungusların oluşturdukları antibiyotik grubunda düşünmek de olasıdır.

Mikotoksinlerin küflerin sekonder metabolitleri oldukları bilinmekle beraber neden bu sekonder metabolitlerin üretildiği henüz tam olarak anlaşılmış değildir. Bir diğer deyiş ile küflerin bu maddeleri üretmekle ne kazandığı henüz bilinmemektedir.

Mikotoksinler, küflerin metabolizmalarına katkıda bulunamayacak kadar düşük molekül ağırlığındaki bileşiklerdir. Mikotoksin üretimi, tür hatta suş ile sınırlıdır.

Çoğu mikotoksin hücre dışına salınır. Oysa primer metabolitler, hücre yaşamı için gereken bileşiklerdir.

Mikroorganizma, bitki, insan ve hayvanlar tarafından oluşturulan ve çok geniş bir yelpazeye yayılan sekonder metabolitlerin canlılar âleminin ekosisteminde önemli görevlerinin olduğu tahmin edilmektedir.

Mikroorganizmaların sekonder metabolitleri sentezlemedeki amacı konusunda çeşitli görüşler vardır. Bu metabolitler, küflerin çoğalma evresinin sonuna doğru

veya durma evresinin başında sentezlenmektedir. Metabolizmanın tamamen durmasındansa düşük bir akışla süren sekonder metabolizmanın mikroorganizma için bir avantaj oluşturduğu, hücrede biriken bileşiklerin hücreden uzaklaştırılabilecek maddelere çevrimini olanaklı kıldığı ileri sürülmekte, antibiyotik ve mikotoksinlerin antagonizm için gerekli olduğu düşünülmektedir. Ancak ileri sürülen bu fikirler, suda çözünemez bir endotoksin olan sterigmatosistinin salgılanmayarak miseller içerisinde birikmesine bir açıklama getirmemektedir. Buna karşıt görüşte ise sentezlenen sekonder metabolitler mikroorganizmalar tarafından doğrudan kullanılmadığı için "metabolizmanın yonga ve talaşları" (metabolizmanın gereksiz metabolitleri) olarak tanımlanmaktadır. Antogonistik ilişkilerin doğada pek saptanamaması, sentezlenen ürünlerin miktarca çok düşük olması, antibiyotiklerin genellikle üretici mikroorganizmayı da baskılaması sekonder metabolizmanın amacını açıklayamamaktadır. Pek çok sekonder metabolit sentezini determine eden genin mikroorganizma için yük olduğu, evrim içinde bu genlerin çok uzun yıllar öncesinde delesyonla DNA'dan ayrılmaları gerekirken, sürüklenip bugüne geldikleri düşünülmekte ve sonuç olarak evrim içerisinde doğanın tahmin edilenden daha fazla konservatif (muhafazakâr) davrandığı ileri sürülmektedir.

Mikotoksinleri, sentezlerini gerçekleştiren küf cins veya türlerine göre ayırt etmek ve sınıflandırmak mümkün değildir. Örneğin, "A" küfü "a" ve "b" mikotoksinlerini üretirken "c" mikotoksinini "A", "B" ve "C" küfleri üretebilir.

Mikotoksin sentezi için özel koşulların oluşması gerekir. Mikotoksinler genellikle yüksek sıcaklıklara dirençlidirler. Küfler, antibiyotiklerden farklı olarak genellikle kendi sentezledikleri mikotoksinlerden olumsuz etkilenmezler. Mikotoksinler, bakteri toksinlerinin aksine küçük moleküllü bileşiklerdir. Bazı mikotoksinler, endotoksin olarak misel içinde birikirken birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülür. Bu nedenle küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırılsa bile ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmaz.

10.02. Mikotoksinlerin Tarihçesi

Küflerin insan ve hayvanlarda hastalık yaptıklarına, hatta sporadik veya toplu ölümlere yol açtıklarına ilişkin veriler çok eski tarihlere gider. M.Ö. 600 yılında çavdarmahmuzu adı ile anılan *Claviceps purpurea* sklerotialarıyla (ergotoksin) bulaşmış tahılların zararlı etkilerinden Asur tabletlerinde söz edilmiştir.

M.Ö. 400 yılında Sparta'da toplu zehirlenmeye ilişkin ilk kayıtlar bulunmuştur. Orta çağda binlerce insan ergotizme yakalanmış, o tarihlerde Aziz Antonius humması adı verilen hastalık literatüre karıncalanma ve uyuşma semptomları gösteren sinir hastalığı olarak geçmiştir.

Atların küflü yemlerle beslenmeleri sonucundaki ölümlere özellikle Doğu Avrupa'da rastlanmıştır. Atların zehirlenerek ölümüne neden olan etkili mikotoksinler at başına alınan 1 mg doz akut etkiye ve hayvanın 6-72 saat

içinde ölümüne neden olur. Küflü mısırlarla beslenen at ve sığırların ölümüne ilişkin raporlar 1927 yılına kadar uzanır.

1942-1944 yılları arasında Rusya'nın Orenburg bölgesinde binlerce insanın ölümü ile sonuçlanan hastalık, "Alimentary Toxic Aleukia, ATA" (beslenmeye bağlı toksik etki ile kanda lökosit sayısının düşmesi sonucu oluşan lösemi) olarak tarihe geçmiştir. Bu büyük yıkıma, savaş nedeni ile tarlada kışlatılan tahılların yol açtığı anlaşılmıştır.

1960 yılında İngiltere'de 100 bin hindi yavrusunun ve ABD'de 1 milyon genç forellenin (alabalık) ani ölümü şaşkınlık yaratmış, hastalığa "Turkey X hastalığı; bilinmeyen hindi hastalığı" ismi verilerek nedenleri araştırılmıştır. Sonuçta hindi palazlarının yemlemesinde kullanılan Brezilya kökenli küflü yer fıstığı küspesinden *Aspergillus flavus* izole edilmiş ve onun metabolitinin ölüme neden olduğu gösterilmiştir. Bu metabolit daha sonra aflatoksin olarak adlandırılmıştır ⇒ ***A****spergillus* ***fla****vus*.

10.03. Hammaddenin Mikotoksijenik Küflerle Bulaşması

Küfler doğada çok yaygındır. Sporları rüzgârla her yere taşınır. Sinekler ve böcekler de küflerin taşınmasında etkilidir. Dolayısı ile bitkisel ürünler hasat öncesi zaten çeşitli küflerle bulaşmış durumdadır. İncirlere, incir yaban arısı (ilek sinekleri) ile küf bulaştırılır.

Hasat öncesinde tüm bitkiler hastalık ve zararlılara karşı belirli bir direnç gösterirler. Hasattan sonra bu direnç zamanla azalır. Bu direnç azalmasına bağlı olarak hastalık ve zararlıların etkisi artar. Kuşkusuz hasat öncesinde de bitkisel ürünlerde küf gelişmesine bağlı olarak önemli hastalıklar ve ekonomik kayıplar meydana gelmektedir.

Küfler, yetersiz temizlik yapılmamış silolarda sürekli bulunur ve gelen ürünü kontamine eder. Ancak küflerin tanelere bulaşması asıl olarak hasat sırasında olur. Kontaminasyonda toprak, sap ve yapraklar öncelikli role sahip değildir, buna karşın biçme yöntemi önemlidir. Elle (orakla) biçmeye oranla biçerdöverlerle yapılan hasatta *Penicillium* türleri ile kontaminasyonun 250 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Biçerdöverlerin elevatörleri ve depo tanklarının içi küflerin kontaminasyon kaynaklarıdır.

Çok genel olarak *Fusarium* ve *Claviceps* spp.'nin hasat öncesi, *Aspergillus* ve *Penicillium* spp.'nin hasattan sonra bitkisel ürünlere bulaştığı söylenebilir. Bu sadece bir genellemedir ve incirlerin hasat öncesi *Asp. flavus* ile bulaştığı bilinmektedir.

10.04. Gıdaların Mikotoksinlerle Kontaminasyon Yolları

Gıdalara mikotoksin bulaşması çeşitli yollarla gerçekleşir. Gıdanın gözle fark edilir şekilde küflenmesi, mikotoksinin direkt kontaminasyonuna neden olur. Bitkisel ürünlerden tahıllarda, baklagil tanelerinde (soya fasulyesi, fasulye vb.), fındık, yer fıstığı, ceviz, Antep fıstığı, badem, ayçiçeği tohumu, pamuk tohumu gibi yağlı tohumlarda, meyvelerde ve baharatta mikotoksin kontaminasyonu direkt yolla ve önemli düzeyde meydana gelir. Gözle görülür şekilde tüm ürünün küflenmesi, ürünün işlenmesini ve tüketimini olanaksız hale getireceğinden herhangi bir risk taşımaz. Ancak ürün partilerinin çok az bir kısmında başlayan küflenme, özellikle depolamada mikotoksin riskini arttırır. Bitkisel ürünlerde mikotoksin kontaminasyonu tarlada olgunlaşma evresinden başlayarak hasatta, kurutma aşamasında ve ağırlıklı olarak da depolanma evresinde meydana gelir. Hasat sonu fizyolojisi çerçevesinde hasat edilen ürünün doğal savunma mekanizması giderek azalır ve yer fıstığı, fındık vb. ürünlerde toksin oluşumu hasat edilen ürünlerin kurutulma aşamalarında başlar. Kırılan, hasar gören fındık ve fıstık kabukları, küf misellerinin iç taneye geçişine ve mikotoksin oluşturmasına olanak sağlar. Bu durum ayrıca nem oranında küçük de olsa dalgalanmalara neden olur. İstatistiksel verilere göre parti içindeki yer fıstıklarında 1:700 ve Antep fıstıklarında 1:4500 oranında aflatoksinle kontamine tane bulunduğu tahmin edilmektedir.

Direkt kontaminasyon ekmekte, meyvelerde, doğal küflerle olgunlaştırılan et ürünlerinde, süt mamullerinden özellikle peynirlerde görülür. Ancak mikotoksin içerikleri yüksek düzeyde olan küflenmiş ekmek, küflenmiş meyveler tüketilmeyecek görüntüde olduklarından direkt tüketim için risk oluşturmazlar. Dış ülkelerde geleneksel olarak üretilen çiğ sucuk benzeri, ancak küfle olgunlaştırılan mamuller büyük risk taşırlar. Bunların üretiminde belli bir *Penicillium* türü starter olarak kullanılmakla beraber startersiz olarak doğal küf popülasyonundan yararlanılarak üretilen fermente et ürünleri de bulunur.

Süt ürünlerinden çeşitli küflü peynirlerde çok sayıda mikotoksin gösterilmiştir. *Penicillium roqueforti* kullanılarak üretilen ve dünyada en yaygın küflü peynir olan Rokfor peynirinde *Penicillium roqueforti* mikotoksinin (PR toxin) farelerde aşırı doz uygulamalarında kansere yol açtığı bildirilmiştir. Ancak insanların bu dozda toksini içerecek kadar aşırı miktarda rokfor peyniri tüketmeleri beklenmemektedir. PR toksin ile ilgili olarak aşağıda belirtilen IARC kategorisinde bir gruplandırmaya rastlanılamamıştır.

Ayrıca sert peynirlerin kabuklarında ve dış tabakalarında, yumuşak ve yarı sert peynirlerin, eritme peynirlerinin yüzeylerinde bugüne değin aflatoksin, sitrinin, siklopiazonikasit, mikofenolikasit, OTA, patulin, penisilikasit, penitrem A, sterigmatosistine rastlanmıştır. Bununla beraber mikotoksinlerin bulaşma sıklığı ve derişimleri düşüktür. Toksinlerin peynir kitlesine kabuktan veya yüzeyden itibaren birkaç cm derinliğe kadar difüze olabildikleri, sitrinin ve OTA'nın ise 8 cm derinliğe kadar inebildiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Türkiye'de

kaşar peyniri depolama örneklerinden izole edilen dominant floranın ağırlıklı olarak mikotoksijenik küflerden oluştuğu gösterilmiştir.

Gıdaların mikotoksinlerle dolaylı kontaminasyonu, mikotoksinle kontamine olmuş hammaddelerin veya katkı maddelerinin gıda üretiminde kullanılmasıyla meydana gelir. Patulinle bulaşık meyvelerin meyve suyu ve konsantrelerine işlenmesi, aflatoksin içeren incirlerden kuru incir ve incir ezmelerinin üretilmesi indirekt yolla kontaminasyonlara örnek oluşturur.

Gıdaların mikotoksinlerle kontaminasyonlarında "carry over; taşınma" olarak adlandırılan üçüncü bir yol daha vardır. Çiftlik hayvanları, mikotoksinlerle kontamine olmuş yemlerle beslendiklerinde toksinleri metabolize ederek büyük kısmını idrar ve dışkı ile atarlar. Ancak metabolize formlara kanda, sütte, bazı organlarda, hatta ender olarak yağlı kas dokularında rastlanır. Aflatoksin içeren yemlerin süt ineklerine yedirilmesi sonucu aflatoksin B_1 (AFB_1) ve aflatoksin B_2 (AFB_2), sırasıyla aflatoksin M_1 (AFM_1) ve aflatoksin M_2 (AFM_2)'ye dönüşerek kalıntı halinde sütte ortaya çıkar. Besi sığırlarında AFB_1 ve AFB_2 kalıntıları en fazla karaciğer ve böbreklerde bulunmuştur. Kaslarda aflatoksin türevlerine hem daha ender hem de çok daha düşük miktarlarda rastlanır.

Mikotoksin taşınmasına Kuzey Tanzanya'da emziren annelerin sütünde de rastlanmıştır. Anne sütlerinin %44'ünde fumonisin saptanmıştır. Anne sütlerinin bir kısmında Avrupa Birliği bebek maması için belirlenen sınırın üzerinde AFB1 tespit edilmiştir.

Gıdalarda ve yemlerde bulunmasına izin verilen mikotoksin limitleri, ülkelere göre farklılık göstermekte ve zaman içinde bu limitler değişebilmektedir. Türkiye için bu limitlere internet üzerinden "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği" sorgulaması ile erişilebilir.

10.05. Mikotoksinlerin Canlılara Etkileri

Mikotoksikoz, mikotoksin içeren gıda ve yemlerin tüketimine bağlı olarak insanlarda ve hayvanlarda görülen tüm hastalıkların genel adıdır. Mikotoksin çeşidine ve alınan yüksek miktara bağlı olarak akut mikotoksikoz ölüme yol açar. Yine mikotoksin çeşidine, ancak alınan daha düşük miktara ve alımın tekrarlanma sıklığına bağlı olarak görülen kronik mikotoksikozda, bağışıklık sisteminde zayıflama görülür ve bunun sonunda başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklar ortaya çıkar. Kanser, en önemli mikotoksikozdur.

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer; IARC), kanser oluşturma riski açısından farklı kategoriler belirlemiştir. Bunlardan grup 1, insanlarda kanser oluşturduğu kesin olanlar; grup 2A, insanlarda kanser oluşturma olasılığı bulunanlar; grup 2B, insanlarda kanser oluşturma olasılığı grup 2A'dan daha düşük olanlar; grup 3, insanlarda kanser oluşturduğu saptanmamış olanlar ve grup 4, muhtemelen insanlarda kansere neden olmayanlar şeklindedir.

Mikotoksinler içinde yüksek organizmalara en etkili olan aflatoksinlerdir ve IARC tarafından grup 1 olarak, fumonisinler ve okratoksin A, IARC tarafından grup 2B'de kategorize edilmişlerdir. Buna göre, aflatoksinin kanser oluşturduğu kanıtlanmıştır. Fumonisinler ve okratoksin A'nın insanlarda kansere neden olmaları beklenebilir. Fumonisinler ve okratoksin A, insanlarda başka hastalıklara neden olan önemli mikotoksinlerdir.

Mikotoksinlerin bir kısmı ise deri nekrozları, lökopeni (kanda lökosit sayısının azalması) ve immunosupresif etkiler (bağışıklık sisteminin baskılanması) ile belirginleşirler ve ağır hastalıklara neden olurlar. Daha az dozların uzun süre alınmaları sonucunda kronik hastalıklar görülür. Bunlar özellikle karaciğer ve böbrek gibi organlarda hastalıklar, dejenerasyonlar, kusurlu ve eksik organ oluşumları, üremede azalma ve kilo kaybı gibi bozukluklardır. Akut toksik etkiye bireyin duyarlılığı, genetik ve fizyolojik özellikleri ve çevresel faktörler etkendir. Kanser, üzerinde en önemle durulan ayrı bir konudur.

Mikotoksinlerin insanlar üzerindeki etkilerini net olarak söyleyebilmek olanaklı değildir. Hayvan denemelerinde akut ve kronik etkileri saptanan mikotoksinlerin insanlar için de tehlikeli olabileceğinden kuşku duyulmamalıdır. En azından bu mikotoksinlerin gıdalarda ve yemlerde bulunması tolere edilmemelidir.

10.06. Mikotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Mikotoksin oluşumunu etkileyen birçok faktör bulunmakla beraber, bunların başında çevresel faktörler gelir. Sıcaklıkla birlikte bağıl nem, öncelikle fungus sporlarının çimlenmesini ve misellerin gelişmesini, ardından da toksin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Tarım ürününün veya gıdanın çeşidi, kimyasal kompozisyonu, ürünün yetiştirildiği klima zonu, ürünün olgunluk durumu, hasat, işlemler ve depolama, bulaşan küflerin spektrumuna etki eden diğer faktörlerdir. Her şeyden önce, tarımsal ürünün veya gıdanın küf spektrumunda bulunan küflerin potansiyel mikotoksin üreticisi olup olmadıkları önem taşır. Kontamine küfler mikotoksin üreticisi olsalar bile toksinin sentezlenmesine ürünün nem içeriği, sıcaklık, işleme ve depolamada havanın bağıl nemi etkendir. Ayrıca atmosferik oksijen, diğer modifiye atmosfer gazları, ışık, süre ve pH gibi faktörlerin de etkisi vardır.

Tahıllar, baklagil taneleri, yer fıstığı, fındık, ceviz, badem, yağlı tohumlar, baharat ve bazı meyveler doğal korunma sistemlerine sahiptirler. Bitkisel ürünlerin çoğu, hasat işlemi ve proseslerden önce küf zararlarından korunur. Çünkü biyolojik olarak dışarıdan kabuk, çekirdek veya tohum kabuğu ile çevrelenmişlerdir. Ayrıca eterik yağlar, antibiyotik etkili maddeler, fitositler dış dokuda lokalize olmuşlardır. Gelişmekte olan ve %25 su içeren yer fıstıkları küflerle kontamine olmazken, olgunlaşmış fıstıklar çok daha az su içeriğine karşın yerde bırakıldıklarında süratle küflerin hücumuna uğrarlar. Gelişmekte olan bitkide büyük olasılıkla bir savunma mekanizması bulunmaktadır.

Asp. flavus'un et ürünlerinde çok az, buna karşılık su içeriği çok daha düşük olan tahıllarda sıklıkla ve daha fazla aflatoksin oluşturması veya tahıllar içinde mısırın OTA ile kontaminasyona en fazla eğilimli ürün olması hem gıdanın kompozisyonu hem de çevresel faktörlerle açıklanabilecek bir durumdur.

Su Aktivitesinin (A_S) Etkisi

Funguslar bakterilerle kıyaslandıklarında daha düşük bağıl nemde gelişebilirler. Optimum gelişmeleri için A_s 0,97-0,99'dur. En düşük A_s 0,80-0,85'de çimlenebilir ve gelişebilirler. Kserofilik türler en düşük A_s 0,61-0,62 değerlerinde bile gelişmelerini sürdürürler.

Aspergillus, Penicillium ve *Fusarium* türlerinin en düşük A_s değerleri karşılaştırıldığında, *Penicillium* ve *Fusarium* türlerinin daha yüksek A_s değerleri istedikleri, mikotoksin üreticisi bazı önemli *Aspergillus* türlerinin minimum A_s 0,80 değerlerinin altında hatta A_s 0,70-0,71 değerlerinde bile gelişebildikleri görülür. Bu nedenle *Aspergillus*'lar kserofilik küflerden sayılırlar.

Sıcaklığın Etkisi

Funguslar genellikle geniş bir sıcaklık aralığında gelişirler. Mikotoksinlerin yüksek düzeyde sentezlenmeleri, küflerin optimum gelişme sıcaklıklarında veya yakınlarında gerçekleşir. Aflatoksin üreten küfler en düşük 6-8 °C'ta maksimum 50-60 °C'larda gelişebildikleri halde, toksin oluşumu için en düşük 10-13 °C ve en yüksek 42 °C sıcaklık gerekir. Bunların optimum gelişmeleri 35-38 °C olduğu halde maksimum toksin derişimine 25-30 °C'larda ulaşılır. *Penicillium* ve *Fusarium*'lar düşük sıcaklıklarda (<5 °C) gelişebilmelerine rağmen *Aspergillus* türleri bu sıcaklıklarda gelişemez ve toksin oluşturamaz.

İçlerinden sadece *Asp. ochraceus* diğer *Aspergillus* türlerine oranla daha düşük sıcaklık derecelerinde OTA sentezleyebilir. Burada optimumdan sapma oldukça mikotoksin üretiminde azalma olmasına rağmen uzun süreli depolamalarda mikotoksin birikiminin artacağı göz ardı edilmemelidir. Mikotoksin sentezini engellemek için depolama sıcaklığının daha düşük tutulması durumunda tanelerin nem içeriği biraz daha yüksek olabilir.

Diğer Faktörlerin Etkisi

Mikotoksin oluşumuna pH'nın, atmosferdeki oksijenin, ışığın ve CO_2'in etkileri laboratuvar denemeleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu araştırmalar aflatoksin ve patulin üzerine yoğunlaşmıştır.

Fungusların gelişebilmek için asit ortamları daha fazla tercih ettikleri, bununla beraber pH 1,5-8,5 arasında gelişebildikleri bilinmektedir. Aflatoksin üreticileri pH 2,5-6,0 arasında toksin oluştururlar, ancak yüksek miktardaki üretimi pH 5,0'den başlayarak daha yüksek pH'larda gerçekleştirirler. *Hypomycetes* sınıfında bazı küflerin atmosferik oksijen azaldığında gelişmelerinin yavaşladığı, ancak durmadığı görülür. Enerjilerini oksidatif fosforilasyon ile

sağlayan bu küfler, oksijen yokluğunda veya azalmasında alkol fermantasyonunu alternatif yol olarak kullanarak gelişmelerini sürdürebilirler.

Aflatoksinin karanlıkta daha fazla sentezlendiği bulunmuştur.

Modifiye atmosfer ortamında kullanılan CO_2, belli bir oranda hem aflatoksin hem de patulin oluşumunu engellemektedir. Soğuk hava depolarında %20-40 CO_2 içeren atmosfer, depolanan meyvelerde küf gelişimine ve patulin oluşumuna imkân vermez. *Asp. flavus* ile yürütülen bir çalışmada %99 bağıl nem, 30 °C sıcaklık ve %20 CO_2 ortamında küfün bol misel geliştirmesine rağmen aflatoksin üretiminde önemli ölçüde azalma sağlanmıştır. CO_2 miktarı %80'lere çıkarılsa bile misel oluşumunun engellenemediği, ancak aflatoksin oluşumunun daha da azaldığı belirlenmiştir.

10.07. Aflatoksin

Aflatoksinler, difuranokumarin yapısında bileşiklerdir. 20 kadar aflatoksin vardır, ancak B1, B2, G1, G2, M1, M2 olmak üzere 6 aflatoksin önemlidir. Aflatoksin B1, AFB1 olarak da ifade edilir. Aynı adlandırma diğerleri için de geçerlidir. B "blue", G "green" ve M "milk" kelimelerinden türetilmiştir. B ve G, ince tabaka kromatografisinde uzun dalga boylu (365 nm) UV altında aflatoksinin mavi ya da yeşil floresan vermesi ile ilişkilidir. M grubu aflatoksinler ise süt kaynaklıdır.

Aflatoksin Oluşturan Funguslar ve Toksin Oluşum Koşulları

Aflatoksin, asıl olarak *Asp. flavus* ve *Asp. parasiticus* tarafından üretilir. Bu 2 tür dışında, aflatoksin oluşturduğu saptanmış 10 kadar küf türü daha vardır, ancak bunlar ya doğada çok nadir bulundukları ya da aflatoksin oluşumunun sadece laboratuvar koşullarında gerçekleşmesi nedeniyle aflatoksin oluşturucu olarak dikkate alınmazlar.

Aflatoksin oluşturduğu saptanan ilk fungus *Asp. flavus*'dur. Bu türün bütün suşlarının toksin sentezlemeleri söz konusu değildir. Gıdalardan ve yemlerden izole edilen ve toksin üretimi açısından test edilen 3000 kadar *Asp. flavus* suşundan sadece % 76'sının bu yeteneğe sahip olduğu gösterilmiştir.

Aspergillus'lar mezofilik karakterli olup 6-8 °C'tan 50-60 °C'a kadar gelişebilirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 35-38 °C'tır. 10-13 °C altında ve 41-42 °C üzerinde aflatoksin oluşumu sınırlanır. En yüksek toksin oluşumuna ise 25-30 °C'larda ulaşır. Yapılan denemelerle belirli bir sabit sıcaklıkta ve sürede oluşan aflatoksin düzeyinin dalgalı sıcaklıklarda ve aynı sürede oluşan aflatoksin düzeyinin ancak 1/4'ü kadar olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, hava sıcaklığının mevsimsel değişimi ve gece/ gündüz sıcaklık farkının aflatoksin sentezini desteklediği sonucunu çıkarır.

Asp. flavus ve *Asp. parasiticus*, diğer bazı *Aspergillus* türleri ile birlikte kserofilik küfler içinde yer alır. *Penicillium* türleri de birçok fungus cinsine oranla daha düşük minimum A_s değerlerinde gelişebildikleri için kserotolerant funguslara dâhildir. *Aspergillus*'ların optimum gelişmeleri için gereken A_s 0,97-0,99 olmakla birlikte gelişimlerini A_s 0,80 değerinin altında da sürdürebilirler.

Asp. parasiticus gelişimi için en düşük A_s 0,78-0,84 değerlerini talep ederken *Asp. flavus* en düşük A_s 0,78-0,82 değerini ister. Toksin oluşumu için her ikisi de biraz daha yüksek minimum A_s değerlerine gereksinirler (*Asp. parasiticus* en düşük A_s 0,87, *Asp. flavus* en düşük A_s 0,83-0,87). Aflatoksin oluşumu için fungus türüne göre farklılık gösteren minimum A_s değeri, substrata göre daha da farklılaşır. Toksinin sentezlenebilmesi için en düşük A_s değerleri pirinçte 0,70-0,75; mısırda 0,80; yer fıstığında 0,85 ve salamda 0,94 olarak belirlenmiştir.

Aflatoksin oluşturan küflerin en yüksek düzeyde aflatoksin oluşturmaları pH 5,0-6,0'da gerçekleşir. pH 4,0'ün altındaki ortamlarda gelişip toksin oluşturabilirlerse de hem misel gelişimi çok yavaşlar hem de toksin miktarı iyice azalır. Toksin sentezlenmesine en uygun substratlar glikoz, galaktoz ve sakkarozdur. Maltoz ve laktoz ikinci derecede elverişli, sorbitol ve mannitol ise elverişsiz substratlardır. Düşük tuz konsantrasyonlarının (%1-3 NaCl) gelişimi ve toksin oluşumunu olumlu etkilediği, %8 NaCl düzeyinin gelişmeye ve toksin oluşumuna fazlaca imkân vermediği %14 NaCl konsantrasyonunda ise küf gelişiminin tamamen durduğu görülür. Aflatoksin oluşumu atmosferdeki O_2 konsantrasyonun azalması veya CO_2 ve N_2 gazları konsantrasyonlarının modifiye atmosfer içinde artışı ile önemli düzeyde geriler.

Aflatoksinlerin Etkisi

Vücuda alınan aflatoksinin (özelikle AFB_1) neden olduğu akut, subakut ve kronik olarak seyreden mikotoksikosise (mikotoksikoza) "aflatoksikosis (aflatoksikoz)" denir. Hayvanlar üzerinde yapılan çok sayıda araştırma, toksinin karsinojen (kanserojen) olduğunu göstermiştir. At, sığır, domuz, koyun, keçi, köpek, maymun, rat, fare, hindi, tavuk, ördek, gökkuşağı alabalığı gibi hayvanlar aflatoksine duyarlıdırlar. İçlerinde en duyarlı hayvan ördek yavrularıdır ve bu nedenle aflatoksin ve türevlerinin toksisitelerinin belirlenmesinde genellikle ördek yavrularından yararlanılır.

Tarımsal ürünlerde, gıdalarda ve yemlerde en sıklıkla görülen aflatoksinlerin toksisite sıralaması $AFB_1 > AFM_1 = AFG_1 > AFB_2 > AFG_2 > AFM_2$ şeklindedir. Farklı hayvan türleri üzerinde belirlenen LD_{50} dozlarından bu sıranın fazlaca değişmediği, bazı hallerde toksik sıralamada AFM_1'in AFG_1'in, AFM_2'nin de AFG_2'nin önüne geçtiği veya eşitliği koruduğu görülür.

Hayvanlarda akut seyreden aflatoksikosiste vücudun direk etkilenen bölgesi karaciğerdir.

Karaciğer kanserlerinin yüksek oranda görüldüğü ülkeler veya bölgeler ile o ülke veya bölge insanlarının tükettikleri besin maddeleri ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Afrika'da Büyük Sahra'nın güneyinde kalan bölgeler ile Güneydoğu Asya'da hepatoselüler karsinomaların çok fazla olduğu, Mozambik'te karaciğer kanser vakalarının ABD'ye oranla 500 kez yüksek seyrettiği belirtilmiştir. Özellikle tropik zonda bulunan ülkelerde, iklime ve beslenme biçimlerine bağlı olarak daha fazla aflatoksin içerikli gıdalar tüketilir.

Epidemiyolojik çalışmalar da aflatoksin içeren gıdalarla beslenen bölge insanlarında primer karaciğer kanserlerine ve karaciğer sirozlarına daha yüksek oranda rastlandığını gösterir. Danimarka'da primer karaciğer kanseri %0,18 ve ABD'de %1,7 iken sürekli yer fıstığı ile beslenen Bantus (Sudan) toplumunda bu oran %14 olarak saptanmıştır. Sürekli yer fıstığı tüketiminin karaciğerde yağlanmaya neden olacağı ve bunun da kansere yakalanma riskini artıracağı belirtilmektedir. Ayrıca beslenmede protein eksikliğine bağlı olarak Afrika, Güney Amerika, Hint Adaları'nda çocuklarda görülen "Reye Sendromu" ve "Kwashiorkor" çocuk hastalıklarının ortaya çıkmasında aflatoksin içerikli besinlerin rol oynadığı da ileri sürülmektedir. İnsanlarda aflatoksinin akut etkisine örnek oluşturabilecek vakalar da kayıtlara geçmiştir.

Hindistan'ın 200 köyünde görülen ve 397 hastadan 106'sının ölümü ile sonuçlanan hastalanmalarda, tüketilen gıdalarda *Asp. flavus*'un gelişmiş olduğu ve yüksek miktarda aflatoksin ürettiği belirlenmiştir.

AFB_1'in kanserojen etkisinin yanı sıra, mutajen, teratojen ve immunosupresif etkilere sahip olduğu hayvan denemeleriyle gösterilmiştir. Immunosupresif etkisi nedeniyle aflatoksin, hayvanlarda çeşitli aşılara karşı yeterli bağışıklık oluşmasını engellemekte, çeşitli enfeksiyonlara karşı da direnci azaltmaktadır.

Aflatoksinle Kontamine Gıdalar

Aflatoksin en fazla bitkisel ürünlerde görülür. Yer fıstığı, fındık, Antep fıstığı, badem, çam fıstığı ve mamulleri en riskli gıdalardır. Tahıllar, aflatoksinle bulaşık olabilir ve bunların değirmencilik ve fırıncılık ürünleri de risk taşır. Baklagiller içerisinde soya fasulyesi öne çıkar. Yağlı tohumlardan pamuk, ayçiçeği, susam ve kolza tohumlarında sıklıkla rastlanır. Bu tohumlarda ve yağ içeriği fazla olan diğer ürünlerde daha fazla görülmesi, küflerin gelişimi için gerekli olan bağlı olmayan su oranının yüksek olmasıyla açıklanır. Kırmızı toz biber ve kuru meyvelerden incir aflatoksin açısından önde gelen riskli ürünlerdir.

Genel olarak süt, süt tozu ve peynirlerin dışındaki hayvansal gıdalarda aflatoksin hem daha ender bulunur hem de konsantrasyonu daha düşüktür.

Türkiye'nin fındık konusunda geçmiş yıllara ait kötü deneyimleri vardır. 1967 yılında Kanada'ya ihraç edilen Türk fındıkları aflatoksin varlığı gerekçesiyle iade edilmiştir. Ancak daha sonraki yıllarda aflatoksin analizlerinin daha iyi

yapılması sonucunda ihraç ürünlerinde bu sorun kalkmış ya da önemli ölçüde azalmıştır.

Büyük ölçüde margarin üretiminde kullanılan yer fıstığı yağlarında aflatoksin riski bulunmaz. Bu yağlar toksin içeriği yüksek fıstıklardan üretilseler bile, proses sırasında alkali ekstraksiyon uygulaması ile sorun tamamen ortadan kalkar.

Dünyada ihraç Antep fıstıklarında %80'lere varan kontaminasyon oranları %13 düzeylerine gerilemiştir. Antep fıstığı ihraç eden ülkeler, daha özenli bir hasat ve depolamanın yanı sıra otomatik aletlerle floresan veren tanelerin ayrımına yönelmiş ve bu yolla aflatoksin içeriği %50 düşürülebilmiştir. Bunun üzerine 22 kg olarak alınan örneğin bile partiyi temsil edemeyebileceği tartışmaları başlamıştır.

Cevizlerde aflatoksin içeren tanelerin 1/28250 oranı ile bulunduğu tahmin edilmektedir. Bu oranın yer fıstıklarında 1/700, Antep fıstıklarında 1/4500 olarak hesaplandığı düşünülürse cevizlerin aflatoksinle kontaminasyon olasılığı daha azdır.

Kuru meyvelerde mikotoksin kontaminasyonuna ender olarak rastlanır. Kuru meyvelerin dayanıklılığı ürünlerde A_s= 0,75 olduğunda en az 6 ay, A_s= 0,70 veya altında olduğunda en az 1 yıl dayanma süresi tahmin edilir. Tüm meyveler içinde incirin aflatoksin oluşumuna en uygun substrat olduğu görülür. İncirde aflatoksin, *Aspergillus flavus*'la birlikte *Asp. parasiticus* tarafından oluşturulur.

İncirin küf konidileri ile kontaminasyonu ağaç üzerindeyken başlar. Meyveler tozlaşma sırasında incir ilek sinekleri aracılığıyla enfekte olurlar ve meyveler olgunlaşırken aflatoksin kontaminasyonu da başlar. Hasattan sonra kontaminasyonun daha ileri boyutlara ulaşmasını engellemek için meyveler 48 saat süre ile en az 60 °C'ta kurutulmalıdır.

UV lambası altında parlak sarı-yeşil renkte floresan veren kuru incirlerin seleksiyonu oldukça olumlu sonuçlar verir. Bu parlak sarı-yeşil renkli floresana aflatoksinin dışındaki bir metabolit (kojikasit) neden olur.

Süt ineklerinde AFB_1 %0,3 oranında süte geçerek AFM_1 şeklinde ortaya çıkar, ancak en yüksek düzeyde karaciğer ve böbreklerde birikir. Hayvanların kaslarında aflatoksin ya hiç bulunmaz veya çok düşük düzeyde ender olarak görülebilir. Hayvansal gıdalara yemlerden geçen AFB_1'in risk yaratmaması için hayvanların aflatoksin açısından öngörülen sınır değerleri aşmayan yemlerle beslenmeleri gerekir. Yer fıstığı, fındık, süt ve diğer gıdalarla alınan aflatoksin yanında ciğer, et ve yumurta tüketimi ile alınan aflatoksin önemsiz düzeydedir.

Kırmızıbiberde kurutma fabrikalarının devreye girmesi ile sorun çok önemli ölçüde çözülmüştür. Elma suyu ve konsantresinde ise küflü elmaların elle ya da sensörlü ayırıcılarla ayıklanması etkili bir yöntemdir.

Aflatoksin Detoksifikasyonu

Aflatoksinlerin detoksifikasyonunda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Aflatoksinler ısıya çok dirençlidirler ve 237-306 ^{o}C arasında parçalanırlar. 150 ^{o}C üzerinde belirli bir parçalanma sağlandığı bildirilmektedir. Nemin yüksek olması ısıl inaktivasyonu kolaylaştırmaktadır. Yapılan bir çalışmada %30 nem içeren küspenin 100 ^{o}C'ta 2,5 saat tutulması, mevcut toksinin yaklaşık %85'inin azalmasıyla sonuçlanmıştır.

Gama ışınlaması ile aflatoksinlerin yok edilmesi üzerinde pek çok çalışma vardır. Işınlama ile aflatoksin parçalanabilmektedir, ancak neye parçalandığı ve parçalanma ürünlerinin toksisitesi üzerinde bilgi yetersizdir.

Sıvı gıdalarda bentonite adsorbsiyon etkili, ancak ekonomik değildir.

Ozonlama, aflatoksinler üzerinde etkilidir ancak farklı aflatoksinler farklı şekilde etkilenir. Aflatoksinli pamuk tohumu ve yerfıstığı ununun %30 nemde ve 100°C'de 2 saat süreyle ozonlanmasıyla AFB1'in tamamen parçalandığı ancak AFB2'nin aynen kaldığı bildirilmiştir. Ozonlanmış yerfıstığı unu, yavru ördeklerin yemlerine %60 oranında karıştırılmış ve bu ördeklerin vücut ağırlıklarının aflatoksinli yem yiyen ördeklere göre daha düşük bulunduğu belirtilmiştir. Aflatoksinli mısırla karşılaştırıldığında, ozonla muamele edilen unlarda protein etkinlik oranının azaldığı bulunmuştur. Bu sonuca ya temel besin öğelerinin yıkımının ya da yeni toksinlerin oluşumunun neden olduğu düşünülmektedir. Elma suyu konsantresinde patuline karşı ozonlama denemesinde kısa bir süre içinde renk tümüyle açıldığı için bu uygulamanın ne denli etkili olduğunun araştırılmasına gerek duyulmamıştır.

Nocardia corynebacteriodes (eski adı *Flavobacterium aurantiacum*), aflatoksini hücre içine alır ve metabolize ederek tüketir. Sadece laboratuvar çalışmalarında denenmiştir, endüstriyel bir uygulaması yoktur. Benzer şekilde asit, baz ve amonyak uygulamaları da laboratuvar koşullarında başarılı bulunmuştur, ancak bu gibi uygulamalar da endüstriyel ölçekte denenmemiştir.

Özellikle ihraç edilmesi planlanan incirlerde aflatoksin içeren meyvelerin mekanik olarak ayrılması en yaygın uygulamadır. Bu uygulamada en önemli soru, mekanik olarak ayrılmış aflatoksin pozitif incir meyvelerinin ne yapıldığı/ nerede kullanıldığıdır.

10.08. Fumonisinler

İlk kez 1988 yılında Güney Afrika'da tanımlanmıştır. A, B, C ve P olmak üzere 4 grup fumonisin olmakla beraber, asıl önemli olan B grubudur. Bu grubun içinde de FB_1, FB_2 ve FB_3 olmak üzere 3 alt grup bulunur. Tüm fumonisinler içinde FB_1, en önemli fumonisindir. Toplam 15 fumonisin tanımlanmıştır.

Çok sayıda fumonisin üreten *Fusarium* türü varsa da içlerinde en önemlisi *Fus. verticillioides* (syn. *Fus. moniliforme*) türüdür. *Fus. proliferatum* ve *Fus. nygamai* türleri de fumonisin üreticisi küflerdir. *Fusarium* cinsi dışında başka küf cinslerinin de fumonisin ürettikleri saptanmıştır, ancak fumonisin denildiğinde *Fus. verticillioides* ile mısır bitkisi ilk akla gelenlerdir.

Fus. verticillioides mısırda doğal olarak bulunur, mısırda gelişir fakat hastalık yapamaz. Ancak iklim koşullarının değişmesi ve böcek hasarı sonunda fidelerde yanıklık hastalığı, sap ve koçan çürüklüğüne neden olur.

Tüm *Fus. verticillioides* izolatlarının fumonisin üretmediği saptanmıştır. Dolayısı ile mısırda *Fus. verticillioides* varlığı mutlaka fumonisin bulunacağı anlamını taşımamaktadır.

Dünya yıllık mısır üretiminin çok büyük miktarı hayvan yemi olarak değerlendirilmekte ve sadece %4 gibi küçük bir kısmı insan tüketimi için kullanılmaktadır. İnsan nüfus artışı ve hayvan sayısında artışa bağlı olarak küresel ölçekte mısır gereksinimi de artmaktadır. Ancak fumonisin varlığı nedeni ile ileride mısır üretiminde sorun olacağından endişe edilmektedir.

FB_1, mısır ve mısır bazlı gıdalara ek olarak, arpa, buğday, bira, kuru incir, kuru üzüm, fasulye, soya fasulyesi, pirinç, sorgum ve kuşkonmazda tanımlanmıştır. Çölyak hastalığı olan insanlar, mısır ve pirinç bazlı diyetleri nedeniyle fumonisinlere maruz kalma riski daha yüksektir.

Fusarium türleri optimum olarak 20-25 ^oC'ta gelişirler. *Fus. verticillioides*, 25-35 ^oC arasında optimum gelişme gösterir. 17 ^oC'tan düşük ve 35 ^oC'tan yüksek sıcaklıklarda gelişme durur ya da çok yavaşlar. 10 ^oC ve A_s 0,93 altında fumonisin sentezlenemez. *Fus. verticillioides*'in mısırda FB_1 üretmesinin optimum 20 ^oC ve A_s 0,956-0,968 olduğu bildirilmiştir.

Fumonisin B_1, insanlarda muhtemel kanserojen olarak (grup 2B) kategorize edilmiştir. Hayvanların sfingolipit metabolizmasına müdahale ederek beyin ve akciğerlerde farklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur.

Güney Afrika, Çin, Kuzey İtalya ve ABD'de özofagus (yemek borusu) kanserleri, FB_1 ile ilişkili bulunmuştur. Hindistan'da 27 köyün etkilendiği FB_1 kaynaklı vakada küflenmiş sorgum ya da mısır kullanılarak evde yapılan ekmekler, karın ağrısı ve ishale yol açmıştır.

Fumonisinler, ısıya dayanıklı mikotoksinlerdir ve toksin içeriği ancak 150 ^oC'ı aşan sıcaklıklarda azalır.

10.09. Okratoksin

Okratoksin ilk kez 1965 yılında *Aspergillus ochraceus* tarafından üretilen metabolit olarak tanımlanmıştır. Bundan kısa bir süre sonra ABD'de ticari bir mısır numunesinde potansiyel nefrotoksin olarak izole edilmiştir.

Doğada görülen okratoksinler A, B ve C olarak 3 gruba ayrılır. Bunlarda en önemlisi A'dır ve OTA (okratoksin A) olarak ifade edilir. Okratoksin B ve okratoksin C, doğada daha az görülür ve toksisiteleri OTA'ya kıyasla daha düşüktür. OTA, *Asp. ochraceus* dışında, *Asp. carbonarius*, *Asp. niger*, *Penicillium nordicum* ve *Pen. verrucosum* tarafından da üretilir. OTA üreten başka küfler de vardır, ancak gerek doğada nadir bulunmaları gerek ürettikleri OTA miktarının zayıflığı nedeni ile OTA üreticisi küfler olarak önemsenmezler.

OTA, tahıllarda en yaygın olarak bulunan mikotoksindir. Taze ve kuru meyveler, meyve suları ve şarap, baklagiller, inek sütü, baharat, kahve, kakao ile et ürünlerinden böbrek ve karaciğerde bulunur.

Okratoksin üreten küflerin minimum, optimum ve maksimum sıcaklık, pH ve su aktiviteleri cinslere ve türlere göre hatta kontamine olduğu bitkisel ürüne göre değişmektedir.

Aspergillus türleri tarafından üretilen mikotoksinler arasında sadece OTA, aflatoksinler kadar önemli olma potansiyelindedir. Böbrek, öncelikli hedef organdır. Bugüne kadar çalışılmış tüm hayvan türlerinde OTA, böbreklerde nefrotoksik etki göstermiştir. İnsanlarda da benzer etki göstermesi muhtemeldir. OTA ayrıca karaciğer için toksiktir, bağışıklığı baskılayıcı etkisi vardır, potansiyel teratojen ve kanserojendir.

Çoğu insanın kan ve anne sütünde çok düşük miktarlarda OTA olabilir. Orta İtalya'da sağlıklı insanların kan numunelerinin %97'sinde 0,12-2,84 ng/mL düzeyinde OTA saptanmıştır. Fransa'da ise bu oran ve değerler sırasıyla %22 ve 0,1-130 ng/mL OTA şeklinde bulunmuştur.

OTA'nın Endemik Balkan Nefropatisi ile ilişkisi gösterilmiştir. Bulgaristan, Romanya, Bosna-Hersek, Hırvatistan, Sırbistan ve Makedonya'nın Tuna Nehrine yakın bölgelerinde görülen bu böbrek hastalığının OTA içeren tahıl ürünleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

OTA, ısıl işleme dirençli bir mikotoksindir. Standart gıda teknolojisi uygulamaları ile yok edilemez. İmha edilmesi için 250 ^{o}C üzerinde birkaç dk ısıl işlem gerekir.

10.10. Trikotesenler

Trikotesenler, başta buğday ve arpa olmak üzere tahıllarda oldukça yaygın bulunan bir mikotoksin grubudur. Başta *Fusarium, Myrothecium*, *Phomopsis, Stachybotrys*, *Trichoderma* ve *Trichothecium* olmak üzere çok sayıda cins ve tür tarafından üretilirler. Trikotesen deyimi bu grubun ilk tanımlanan üyesi olan ve *Trichothecium roseum* tarafından üretilen trichothecin'den gelir. 200'den fazla trikotesen bulunmakla beraber deoksinivalenol (DON) ve T2, en önemli mikotoksinlerdir. T2 mikotoksini, memeli hayvanlarda DON'a kıyasla 10 kat daha yüksek toksisite gösterir.

İnsanlarda trikotesenler ile ilgili kayda geçmiş hastalık, 1913 yılında doğu Sibirya'da bildirilmiş ve 1932'de batı Sibirya'nın çeşitli bölgelerinde tekrar ortaya çıkmıştır. Her ne kadar 1730'lu yıllarda benzer semptomları gösteren bir hastalık tablosu bildirilmişse de bunun trikotesen bağlantısını kanıtlamak mümkün değildir. Sibirya'da görülen hastalanmaların semptomları karın ağrısı, kusma, diyare, burun, ağız ve diş eti kanaması, nekrotik anjin, agranülositoz ve ateş ile birlikte yüksek bir ölüm oranıdır. Başlangıçta bunun bir salgın olduğu düşünülmüş, ancak hastalanmış bireylerin bakımını üstlenen tıbbi personelin hiçbirinin aynı semptomları göstermemesi (hasta olmaması) nedeniyle bu hipotez reddedilmiştir.

Agranülositoz, kandaki akyuvar hücreleri olan nötrofil sayısının kan dolaşımında çarpıcı bir şekilde düştüğü nadir görülen bir hastalıktır. Bu durum, kemik iliğinde nötrofillerin üretilmiyor olmasından ya da nötrofillerin kan dolaşımına salınmıyor olmasından kaynaklanır. Nötrofillerin koruması olmaksızın vücut bazı enfeksiyon türlerine karşı tamamen savunmasız kalır.

Yine Sibirya'da Orenburg bölgesinde 1942-1948 yılları arasında binlerce insanın öldüğü vaka, T2 toksini ile ilişkilendirilen Alimentary Toxic Aleukia (ATA), bugüne kadar kayda geçmiş en önemli trikotesen hastalanmasıdır. Tahılların geç hasadı ve tarlada kışlatılması sonunda muhtemelen *Fus. sporotrichioides* ve/veya *Fus. poae* tarafından üretilen T2 trikotesen bu vakada etkili olmuştur. Bu vakanın araştırma sonuçlarına göre T2 mikotoksinleri, -2 ^{o}C'ta dahi üretilebilmektedir.

DON, tahıllarda yaygın görülen mikotoksinlerden birisidir. Çiftlik hayvanlarında yüksek dozlarda alındığında mide bulantısı, kusma ve ishale neden olur. Düşük dozlarda alındığında ise beslenme bozukluğuna bağlı kilo kaybı görülür. DON, pek çok kaynakta vomitoxin (kusturucu toksin) olarak tanımlanır.

10.11. Diğer Mikotoksinler

Gıda hammaddelerinde çeşitli küf türleri tarafından oluşturulan pek çok mikotoksin daha vardır. Bunlar arasında, citreoviridin, ergot alkaloitleri, ksantomegnin, luteosikrin, molinoformisin, patulin, rubroskyrin, rugulosin, siklopiazonik asit, sitreoviridin, sitrinin, sterigmatosistin, tenuzonik asit ve zearalenonlar, mikotoksinler ile ilgili araştırmalarda öne çıkan mikotoksinlerdir.

11. SU MİKROBİYOLOJİSİ

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

11.01. Genel Bilgiler **421**
11.02. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik **421**
11.03. Membran Filtrasyon **422**
11.04. Koliform Grup Bakteriler ve *E. coli*; CCA besiyeri **423**
11.05. Toplam Jerm (Koloni) Sayısı **425**

11.01. Genel Bilgiler

Su mikrobiyolojisi, diğer gıdaların mikrobiyolojisinden farklı değildir. Temel prensipler aynıdır. İçme ve kullanma sularında, belirli hacimlerde bulunmasına izin verilen ve verilmeyen bakteriler, virüsler ve parazitler vardır. İlgili yönetmelikte maya ve küflerle ilgili kriterler yoktur. Bu bölümde asıl olarak içme ve kullanma sularındaki bakteriler üzerinde durulmuştur.

İçme ve kullanma suyu ya da başka bir tanımla "İnsani Tüketim Amaçlı Sular" ile kasıt, sadece içme suyu değil aynı zamanda gıda sanayisinde kullanılan sulardır. Kanalizasyon, deniz suyu, açıkta akan dere vb. sular, bu tanımın dışındadır.

Daha önce T. C. Sağlık Bakanlığı tarafından 17 Şubat 2005 tarih ve 25730 sayılı Resmî Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik", zaman içinde bazı değişikliklere uğramıştır. Su mikrobiyolojisini ilgilendiren en önemli değişiklik, içme ve kullanma sularında koliform ve *E. coli* analizinde TS EN ISO 9308-1 numaralı standartta 2014 yılı sonunda yapılmış olan revizyondur. Bu kitabın yayımlanmış olduğu tarihte TS EN ISO 9308-2 (EMS yöntemi) ve TS EN ISO 9308-3 (mikroplak yöntemi) bölümlerinde bir değişiklik yoktur. Okuyucu, tüm standartları ve yönetmelikleri izlemelidir.

Zaman içinde, adı geçen yönetmelikte yapılan ve su mikrobiyolojisini doğrudan ilgilendiren değişiklikler de olmuştur. Örneğin, öncesinde koliform bakteri 0/100 mL olan kriter sonrasında 0/250 mL olmuştur, ancak bu gibi değişiklikler analiz yöntemlerini fazlaca ilgilendirmemektedir.

11.02. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik

İnternet arama motorlarında "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik" sorgulaması yapıldığında yönetmeliğin ve ekinin son güncellemesine erişilmektedir.

Su mikrobiyolojisini ilgilendiren temel kriterler aşağıda verilmiştir. Bu kriterler en son olarak 20 Ekim 2016 tarih ve 29863 sayılı Resmî Gazetede yayımlanmıştır. Aşağıdaki web adresinden bu kriterlere erişilebilir:
http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2016/10/20161020-3.htm

Buna göre, içme ve kullanma sularının yönetmelikte belirlenen hacimlerinde *E. coli*, enterokoklar, koliform grup bakteriler, *Pseu. aeruginosa*, anaerop sülfit redükte eden (indirgeyen) bakteriler, patojen stafilokoklar[1] bulunmamalıdır.

ISO standartlarından farklı olarak içme ve kullanma sularının mikrobiyolojik analizinde 22 °C ve 37 °C'ta toplam aerobik mezofil koloni sayısı belirlenir. Yönetmelikte bu grup için belirli sayılarda bulunmalarına izin verilmiştir.

11.03. Membran Filtrasyon

İlgili yönetmelikte, istenmeyen mikroorganizma (asıl olarak bakteri) analizleri için membran filtrasyon yöntemi ile analiz gösterilmiştir. Bu kitapta, membran filtrasyon ile mikroorganizma analizleri konusunda yeterli bilgi verilmiştir (bknz⇒ 03.05. Membran Filtrasyon, 05.04. Membran Filtrasyon ve 08.03. Membran Filtrasyon bölümleri).

Bu bölümde, içme ve kullanma suları dışındaki sularda (kanalizasyon, atık su vb.) membran filtrasyonla mikrobiyolojik analiz konusu verilmiştir.

Temel mikrobiyolojik analiz yöntemi yayma plaktır. Bu yöntemle sağlıklı sonuç alınamayacak kadar az sayıda mikroorganizma içeren numunelerde dökme plak yöntemi uygulanır. Daha da az sayıda mikroorganizma içeren numunelerde EMS yönteminin uygulanması gerekir. Nihayet 1 mL'sinde 1'den daha az sayıda, örneğin koliform grup bakteri olan numunelerde membran filtrasyon yönteminin uygulanması gerekir. Buna göre örneğin 1000 KOB/mL bakteri olduğu tahmin edilen bir atık su numunesinde yayma plak yöntemiyle analiz yapılmalıdır.

İçme ve kullanma suyu analizi yapılan belediye ve halk sağlığı laboratuvarlarının önemli bir kısmında otoklav, terazi vb. besiyeri hazırlama ekipmanı bulunmaz ve tüm mikrobiyolojik analizler membran filtrasyon sistemi ile yapılır.

Standart 90 mm çaplı bir Petri kutusunda sayılacak ideal koloni sayısı 100 iken sağlıklı bir sayım için en fazla 250-300 koloni olması istenir. Genellikle 45-50 mm çaplı membranlarda ise sağlıklı sayım için gereken üst limit 50 kolonidir.

[1] *Staphylococcus* cinsi içinde insan patojeni başka türler olmakla birlikte burada kastedilen patojen stafilokok, koagülaz pozitif *Staph. aureus*'tur.

Membran filtrasyonla analizi yapılacak su numunesinde tahmin edilen sayı 50 KOB/mL'den fazla ise seyreltme yapılması gerekir. Seyreltme, maximum recovery diluent (MRD: pepton tuz çözeltisi) kullanılarak standart 1:9 şeklinde yapılır.

Yayma ve dökme plak yöntemleri ile yapılan ekimlerde standart seyreltmelerden sonra sırasıyla 0,1 ve 1,0 mL seyreltilmiş numune, doğrudan Petri kutusuna aktarılırsa da membran filtrasyonda bu uygulama söz konusu değildir.

Filtrasyon hunilerine doğrudan 1 mL seyreltilmiş numune aktarılması ve bunun filtre edilmesi ile sağlıklı bir sonuç alınamaz. Bu aşamada sağlıklı sayım sonucu alabilmek için 2 yöntem vardır:

-Hunilere önce ~40 mL kadar steril saf su konulur, 1 mL seyreltilmiş numune bunun üzerine eklenip filtrasyon yapılır.

-Steril kaplarda ~40 mL kadar steril saf su üzerine 1 mL seyreltilmiş numune eklenir, elle iyice çalkalanarak tam bir homojen çözelti elde edilir ve bu çözelti filtrasyon hunisine eklenir.

Görüldüğü gibi, her koşulda ~40 mL kadar steril saf su gerekir. Su mikrobiyolojisi laboratuvarlarında steril saf su elde etmek için pek çok gereç vardır. Benzer şekilde tek kullanımlık steril plastik kaplar da sağlanabilir.

Suların mikrobiyolojik analizinde kullanılan membran filtrasyon sistemleri ve besiyerleri konusuna bu bölümde ayrıntılı olarak yer verilmemiştir.

http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/DosyaGoster.aspx?DIL=1&BELGEANAH=4103&DOSYAISIM=SU%20MIKROBIYOLOJISI.pdf adresinde ve başka kaynaklarda konu üzerinde ayrıntılı bilgi bulanabilir.

11.04. Koliform Grup Bakteriler ve *E. coli*; CCA Besiyeri

İçme ve kullanma sularında koliform grup bakterilerin aranmasında kullanılan TS EN ISO 9308-1 numaralı standart, 2014 yılı sonunda revize edilmiştir. Öncesinde, bu amaçla lactose TTC agar with Tergitol 7 besiyeri[2] kullanılırken revize standartta chromogenic coliform agar (CCA) besiyeri gösterilmektedir. Bu 2 besiyeri arasında önemli farklar vardır.

-Lactose TTC agar with Tergitol 7 besiyerinde tüm koliform bakteriler turuncu renkli koloni oluşturur. Bu koloniler arasında *E. coli*, hiçbir şekilde ayırt edilemez. Sadece turuncu renkli koloni görülmesi yeterli değildir, laktoz pozitif (koliform grup bakteri) sonucun doğrulanması için filtre altında sarı benek görülmelidir.

[2] Diğer pek çok besiyerinde olduğu gibi bu besiyeri de farklı markalarda farklı isimlerle anılır. Örneğin Tergitol TTC NKS.

-CCA, kromojenik bir besiyeri olduğu için zamanla renk değişmesi olmaz. Bu besiyerinde *E. coli* mavi/mor, diğer koliform grup bakteriler ise pembe/ kırmızı renkli koloniler oluştururlar.

CCA besiyerinde gelişen tüm koliform grup bakteriler, ß-D-galactosidase enzimleri ile pembemsi kırmızı koloni oluştururlar. Dolayısı ile *E. coli* kolonisi de aynı renktedir. Ancak *E. coli*, diğer koliform grup bakterilerde bulunmayan ß-D-glucuronidase enzimi aracılığı ile besiyeri bileşimindeki X-Glucuronide substratını da parçalayarak koloninin koyu mavi menekşe olmasını sağlar. Bir başka deyişle koyu mavi menekşe renk, pembemsi kırmızı rengi maskeler ve dolayısıyla *E. coli* kolonileri, diğer koliform grup bakteri kolonilerinden bariz bir şekilde ayrılır.

ß-D-glucuronidase enzimi, Fluorocult LST broth ve Fluorocult VRB agar gibi besiyerlerinin bileşiminde bulunan MUG substratını parçalayarak uzun dalga boylu (~366 nm) UV lamba ışığı ile floresan ışıma sağlayan enzimdir. Farklı enzimlerin farklı substratlara etki etmesi sonunda farklı parçalanma ürünleri oluşturması üzerine pek çok örnek daha vardır, ancak bu konu bu kitabın içeriği dışındadır.

CCA besiyerinin, selektivitesi düşük olduğu ve bu nedenle sadece düşük sayıda bakteri olması beklenen arıtılmış/ dezenfekte edilmiş ya da membran filtrasyonla bakteri yükünden arındırılmış su numuneleri için uygun olduğu unutulmamalıdır. TS EN ISO 9308-1 numaralı standartta bu konu açıkça belirtilmektedir.

Gıdaların, özellikle yoğun refakatçi flora varlığında koliform grup bakteriler ile *E. coli* aranması ve sayılmasında kullanılan chromocult coliform agar ES (enhanced selectivity) (örneğin Merck 1.00850) besiyeri ile suların analizinde kullanılan chromocult coliform agar (örneğin Merck 1.10426) besiyeri bileşimi farklıdır. Chromocult coliform agar ES besiyeri, TS EN ISO 9308-1 numaralı standarda uygun olarak insani tüketim amaçlı sularda koliform grup ve *E. coli* analizinde kullanılmaz.

Kanalizasyon, atık su, yüzey suları ve sığ yüzey suları vb. gibi yoğun refakatçi flora bulunması beklenen su numunelerinde koliform grup bakteriler ile *E. coli* aranması/ sayılması gerekiyorsa standart chromocult coliform agar bu amaçla kullanılamaz. Bu tip sularda TS EN ISO 9308-2 olan bölümüne uygun olarak EMS yöntemi ile analiz yapmalıdırlar.

CCA besiyeri ile ilgili olarak hiçbir şekilde gözden kaçırılmaması gereken bir diğer husus, 24 saatten daha uzun süren inkübasyon sonrasında tipik koliform grup bakteri ve/veya *E. coli* koloni morfolojisinde koloni gelişimi olursa bunların değerlendirmeye alınmaması gerektiğidir. Bir başka ifade ile besiyerinin düşük selektivitesi, refakatçi florayı ancak 24 saat baskılayabilir. Besiyeri bileşimindeki seçilmiş peptonlar, piruvat ve fosfat tampon, ağır hasar görmüş koliformların kendilerini onarmalarını sağlarken yegâne inhibitör Tergitol 7'dir.

TS EN ISO 9308-1 numaralı standarda göre, CCA besiyerinde gelişen tipik kolonilere oksidaz testi uygulanması gereklidir. Oksidaz testi, 06.04.03.09. bölümde verilmiştir.

CCA besiyeri bileşimindeki triptofan varlığına bağlı olarak, gelişen tipik koloniler üzerinde indol testi yapılabilir. İndol pozitif olan *E. coli* için bu test sadece doğrulama amaçlıdır, ancak *E. coli* biyotip 2'nin indol negatif olduğu unutulmamalıdır. Pembemsi kırmızı renkli kolonilerden indol pozitif sonuç veren çıkarsa analiz edilen numunede *E. coli* O157:H7 varlığından ciddi şekilde şüphe edilmelidir. İndol testi sonrasında bakteri izolasyonu mümkün değildir. Bu nedenle pembemsi kırmızı renkli koloniye indol testi yapılacaksa temiz bir lam üzerine Pastör pipeti ile bir damla saf su damlatılıp kolonin bir kısmının bu su damlası içinde tam olarak çözülmesi ve indol testinin burada yapılması gerekir. İndol pozitif sonuç alınırsa her şeyden önce testin yapıldığı lam, uygun bir dezenfektana dikkatlice yerleştirilmelidir. Bu amaçla 1:100 oranında seyreltilmiş ev tipi (%5 derişimdeki) çamaşır suyu kullanılabilir. Sonra, Petri kutusundaki kolonin kalan yarısı ile *E. coli* O157:H7 analizi yapılmalıdır.

Pembemsi kırmızı ve mavi menekşe renkli koloni üzerinde yapılacak indol testi öncesinde, laboratuvar personeli şahit kültür kullanarak deneyim kazanmalıdır.

11.05. Toplam Jerm (Koloni) Sayısı

İnsani tüketim amaçlı sularla ilgili yönetmelikte, ayrı ayrı olmak üzere, 22 ve 37 ^{o}C'ta yapılacak inkübasyon sonrasında elde edilecek koloni sayısının yönetmelikte verilen sınırlar içinde olması istenmektedir. Analiz, TS EN ISO 6222'ye göre dökme plak yöntemiyle yapılır. Buna göre, 1 mL su numunesi üzerine yeast extract agar acc. to ISO 6222[3] (örneğin, Merck 1.13116) dökülür.

Yukarıda 11.03. Membran Filtrasyon bölümünde belirtildiği gibi su mikrobiyolojisi laboratuvarlarının bir kısmında otoklav yoktur ve tüm analizler membran filtrasyon ile yapılır.

ISO 6222'ye aykırı olmakla birlikte, toplam koloni sayımı da membran filtrasyon yöntemi ile yapılabilir. Bu amaçla, yine 11.03 Membran Filtrasyon bölümünde belirtildiği gibi filtrasyon hunisine önce ~40 mL steril saf su aktarılır, analiz edilecek su numunesinden 1 mL eklenir ve filtrasyon sonrasında filtre, genel içerikli bir besiyerine yerleştirilir.

Yönetmeliğe göre, 22 ve 37 ^{o}C'ta ayrı ayrı inkübasyon yapılmalıdır. Bu sıcaklıklarda yapılan inkübasyondan sonra bunlardan herhangi birisinde diğerine kıyasla daha fazla ya da daha az koloni sayısı elde edilmesi mümkündür. Örneğin, 22 ^{o}C'ta yapılan inkübasyon sonunda elde edilen koloni

[3] Bu analizde kullanılan yeast extract agar acc. to ISO 6222 ile yeast extract agar, farklı bileşimde iki farklı besiyeridir.

sayısı mutlaka 37 ºC'ta elde edilen sayıdan daha az ya da daha fazla olur şeklinde bir kural yoktur. Aynı kaynak suyu numunesinde yapılan analizlerde bir gün 22 ºC'taki koloni sayısı 37 ºC'ta elde edilen sayı fazla iken ertesi gün yapılan analizlerde bunun tersi sonuç alınabilir.

HATIRLATMA

Sularda ve gazlarda (örneğin hava) 0,45 ve 0,20 µm porlu filtreler, hiçbir koşulda suyun ve gazların kimyasal yapısında değişiklik yapmaz. Bu filtreler sadece mikroorganizmaların ve bu boyutlardaki fiziksel kirlilikleri (örneğin askıda katı madde) tutulmasını sağlar.

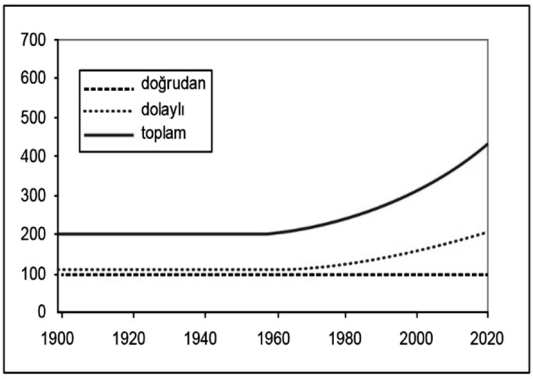
12. GIDA GÜVENLİĞİ

Petek ATAMAN, Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN,
Arş. Grv. Merve AKPINAR

12.01. Genel Bilgiler **427**
12.02. Gıda Güvenliği Yaklaşımı **429**
12.03. Gıdalardaki Tehlikeler **431**
12.03.01. Fiziksel Tehlikeler 431
12.03.02. Kimyasal Tehlikeler 432
12.03.03. Mikrobiyolojik Tehlikeler 435
12.04. HACCP ve ISO 22000 ..... **435**
12.05. Risk Analizi **438**
12.06. Engeller Teknolojisi **440**
12.07. Soğuk/ Donmuş Zincirde Kırılma **442**

12.01. Genel Bilgiler

Başta ABD olmak üzere gelişmiş ülkelerdeki sağlık kayıtları incelendiğinde gıda kaynaklı hastalıkların sayısında yıllara göre giderek bir artış olduğu görülmektedir. Teknolojide ve kalite sağlamada her geçen gün büyük ilerlemeler olmasına rağmen bu artış, basitçe doğrudan ve dolaylı artışlar olmak üzere iki ana nedene bağlanabilir. Hastalık sayısı kayıtlarındaki artışlarda doğrudan artışların payı düşüktür ve dolaylı artışlar asıl sorumludur. Söz konusu bu artışlarda çok genel olarak mikrobiyolojik nedenler ağırlıktadır. Şekil 12.01'de gıda kaynaklı hastalık kayıtlarındaki artış, temsili olarak verilmiştir.



Şekil 12.01. Gıda kaynaklı hastalık kayıtlarında yıllara göre artış

Gıda kaynaklı hastalık kayıtlarındaki doğrudan artışlar özetle aşağıdaki gibi açıklanabilir:

-Kırsal alandan kentlere göç, bütün dünyada giderek artmaktadır. Savaşlar, ekonomik vb. sorunlar bu göçü desteklemektedir. Ancak büyük kentlerde varoş olarak tanımlanan kenar mahallelerde genel hijyen oldukça düşüktür ve dolayısıyla gıda kaynaklı hastalık sayısı artmaktadır.

-Kadınların her geçen gün iş yaşamında daha fazla yer alması, okulların kayda değer bir kısmının tam gün eğitim vermesi gibi pek çok nedenle içinde bulunduğumuz zaman diliminde toplu gıda tüketimi yaygınlaşmaktadır. Gerek yemek fabrikaları arasındaki yoğun rekabet, gerekse bir seferde üretilen ürünün çok fazla sayıda insana ulaşıyor olması, hazır yemeklerin tüketiciye "sıcak" veya "soğuk" olarak ulaştırılmasında yaşanan zorluklar bu sektörü gıda güvenliği açısından riskli sektörler arasına dâhil etmiştir.

-Ulusal ve uluslararası turizm ve ticaret giderek gelişmektedir. Özellikle uluslararası ticarete konu olan gıdalar her zaman beklenildiği kadar güvenli olmayabilmektedir.

-Özellikle gelişmiş ülkelerde organik gıda tüketimi giderek rağbet görmektedir. 2011 bahar aylarında Almanya çıkışlı *E. coli* O104:H4 salgınının temel nedeni Almanların evlerinde yetiştirdikleri (organik) bitki filizleridir.

-Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar bağışıklığı ciddi şekilde düşürmektedir. Devamında hepatit kaynaklı bağışıklık kayıpları, gelişmiş ülkelerde dahi yeterli ölçüde önemsenmemektedir.

-Üretim teknolojisinin geliştiği açıktır. 1980'li yıllarda saatte 5.000 piliç kesimi yapan işletmeler "dev" olarak tanımlanırken 2010'lu yıllarda saatte 10.000 piliç kesimi yapanlara orta büyüklükte işletme gözüyle bakılmaktadır. Geçen 30 yıl içinde piliç kesim kapasitesinin iki misli artmış olmasına rağmen işletmelerde kalite kontrolün bu artışa ayak uydurabildiği konusunda ciddi endişeler vardır.

Gıda kaynaklı hastalık kayıtlarında yıllara göre giderek artışında asıl sorumlu olan dolaylı artışlar ise iki alt başlık altında incelenmektedir:

-Gıda kaynaklı hastalıklarda analiz teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak gerçek neden belirlenebilmektedir. Örneğin, Türkiye'de 2005 yılı kuş gribi salgınında, hastalığın etmeni tam olarak saptanmış ve dünya sağlık kayıtlarına *Avian influenza* H5n1 virüsü olarak kayıtlara geçmiştir. Oysa 2005 yılı öncesinde Türkiye'de bu virüs kaynaklı hastalanmalar ve ölümler hakkında hiçbir veri yoktur. Muhtemelen semptomların benzerliği nedeni ile kuş gribi kaynaklı hastalanmalar ve ölümler, sağlık kayıtlarına zatürre olarak geçmiştir.

-Gıda kaynaklı hastalanmalar konusunda sağlık kayıtlarındaki artışın tüm nedenleri içinde sağlık kayıtlarının giderek daha düzenli olarak tutulması ve kayda geçilmesi en önemli faktördür. Kapitalist ekonomi kurallarına göre hastalanan birey, hastalandığı için işe gidemediği günün ücretini özel sağlık sigortasından alabilmek için bir sağlık merkezinden rapor alarak hastalığını kanıtlamak zorundadır.

Bu konu şöyle özetlenebilir: Gıda üretim teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak gerçek gıda kaynaklı hastalanma sayısı yıllara göre 100; 99; 98; 97... birim azalırken kayıtlara geçen hastalanma sayısı 10; 15; 20; 30… birim artmaktadır. Çok genel olarak gıda kaynaklı gerçek hastalanma sayısının, gelişmiş ülkelerde %10 ve gelişmekte olanlarda ise sadece %1 kadarının kayıtlara geçtiği kabul edilmektedir.

12.02. Gıda Güvenliği Yaklaşımı

Gıda güvenliğinin pek çok tanımı vardır. Çok basit olarak gıdada tehlikelerin bulunmaması olarak tanımlanabilir. Tarımsal hammaddelerin (birincil ürünlerin) üretiminden başlayarak, tüketicinin sofrasına gelinceye kadar olan gıda üretim zincirindeki her aşamada, insan sağlığı gözetilerek tehlikelerin tümüyle ortadan kaldırılması ya da kabul edilebilir ölçüde azaltılması için alınan önlemlerin tümü gıda güvenliği yaklaşımı ile değerlendirilir. Hayvan beslemede kullanılan yemler için de benzer yaklaşımlar geçerlidir.

Buna göre gıda üretim zincirinde yer alan herkes, gıdanın güvenli bir şekilde tüketiciye sunulmasından sorumludur. Çoğu kere bu zincirde yer alan herhangi bir kişinin yaptığı hata, zincirin daha sonraki aşamalarında telafi edilemez.

Giderek artan dünya nüfusu, tarım yapılan topraklarda kentsel yerleşim, çevre ve özellikle suların kirlenmesi, ulusal ve uluslararası göç hareketleri, savaşlar, turizmin yaygınlaşması, gıda arzının politik bir güç haline gelmesi, dünya genelinde ekonomik dengelerin bozulması ve açlık gibi onlarca faktör, insanların sağlıklı bir şekilde beslenmesinde engel oluşturmaktadır. Bunların dışında FAO, hasat edilen tarımsal hammaddelerin yaklaşık üçte birinin tüketicinin sofrasına gelmeden çöpe gittiğini bildirmektedir.

Buna göre gıda güvenliğinin sağlanması, ulusal değil uluslararası bir sorundur ve dünya genelinde konu üzerinde başta eğitim eksikliği nedeniyle her geçen gün daha da zorlaşmaktadır. Gıda israfı da bir çeşit eğitim eksikliğidir.

Tüm bu olumsuzluklara rağmen gıda güvenliği yaklaşımı obezite, dengeli beslenme ve gıdalarda duyusal kalite artırımı ile hiç ilgilenmez. Asıl olan tüketiciye tehlikelerden olabildiğince arındırılmış gıdanın sunulmasıdır. Okul kantinlerinde öğrencilere hamburger ya da geleneksel köfte, gazlı meşrubat ya da ayran ve patates kızartması ya da salata sunulabilir. Gıda güvenliği sadece öğrencilere fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik tehlikelerden arındırılmış gıdaların sunulması ile ilgilenir.

Benzer şekilde gıdalarda şeker ve tuzun azaltılması, uluslararası düzeyde sağlık politikası haline gelmiştir. Şeker yerine yapay tatlandırıcı kullanılmasında olası tehlikeler ve riskler, gıda güvenliği yaklaşımı içinde değerlendirilir. Peynirde tuzun azaltılması ise sadece olası patojenlerin, peynirde gelişebilmesi açısından gıda güvenliğini ilgilendirir.

Bu açıklamalara göre gıda güvenliğinin sağlanmasında tümüyle multidisipliner bir yaklaşımın zorunluluğu açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

Gıda güvenliği yaklaşımı içinde kimi zaman birbirleri ile karıştırılan tanımlar vardır. Aşağıda temel tanımlar verilmiştir.

Gıda Güvenliği/ Gıda Güvenilirliği (*Food Safety*): Tüketilen gıdaların insan sağlığına zarar verebilecek her türlü mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal

tehlikelerden arındırılmış olmasıdır. Alerjenler de gıda güvenliği kapsamı içindedir. Gıda üretim zincirinde yer alan öngörülebilir ve kasıtsız riskleri HACCP vb. uygulamalar ile azaltmayı hedef alır. Gıda güvenliği, birincil ürünlerin üretimi, gıdaların taşınması, hazırlanması, işlenmesi, depolanması, ambalajlanması gibi üretim zincirinde yer alan tüm aşamaların insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileme riskini en aza indirecek, oluşabilecek her türlü zararın önlenebilmesi için alınan tedbirlerin bütünü olarak da tanımlanmaktadır. Buna göre güvenli gıda/ güvenilir gıda, insanlar açısından sağlık riski taşımayan tehlike içermeyen gıda anlamına gelmektedir.

Gıda Güvencesi (*Food Security*): Herkesin güvenli ve sağlıklı gıdaya sürdürülebilir biçimde ulaşabilme hakkını ifade eder. Halkın yeterli ve dengeli beslenmesi için devletlerin gıda stoklarını yönetmesidir. Devletler, bu amaçla protein, karbohidrat vb. temel besin öğelerini yıl boyunca halkın kullanımı için hazır tutarlar. Ayrıca deprem, kıtlık, savaş vb. olağandışı koşullar için de gıda stokları yönetilir.

Diğer yandan gıda güvencesi konusu sadece devletlerin ilgi ve sorumluluk alanında olmayıp, tıpkı gıda güvenliğinde olduğu gibi uluslararası bir boyut da taşımaktadır. Gıda güvencesi konusunu uluslararası boyutu ile yöneten, sorumluluk yüklenen kuruluş, Birleşmiş Milletlerin uzmanlık kuruluşlarından biri olan FAO'dur (Dünya Gıda ve Tarım Örgütü). 16 Ekim 1945'de Kanada'da düzenlenen 1. FAO Konferansı'nda, Dünya'daki gıda ve tarımla ilgili çalışmaları organize edip geliştirerek gıda güvenliğini sağlamak amacıyla kurulan FAO Dünya'daki gıda ve tarımla ilgili çalışmaları organize edip geliştirerek gıda güvencesini sağlamayı amaçlamaktadır.

Ancak ister FAO isterse devletler tarafından halkın sağlıklı beslenmesi için yönetilen gıda stokları, gıda güvencesi çalışmalarında da gıda güvenliği kurallarına tam olarak uyulmalıdır. Ülkemizde "Gıda güvenliği" ve "Gıda güvencesi" terimlerinin kullanılmasında yaşanmakta olan bir kavram kargaşası bulunmaktadır. Gıda mevzuatında "Gıda Güvenliği" ifadesi, 13 Haziran 2010 yılında yayınlanan 5996 Sayılı Kanun'a kadar insan sağlığına uygunluk anlamında kullanılmakta iken kanunun yayınlanması ile bu terim "Gıda Güvenilirliği" olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu kadarla da kalınmayıp, o tarihe kadar "Gıda Güvencesi" olarak kullanılan gıdaya ulaşım hakkı da "Gıda Güvenliği" olarak tanımlanmıştır.

Gıda Savunması (*Food Defence*): Standart gıda güvenliği uygulamalarının bir kademe daha ilerisindeki yüksek standartta önlemlerdir. Gıda Savunması, gıda ürünlerinin normal şartlarda üretim zinciri içinde yer almayan biyolojik, kimyasal, fiziksel ve radyolojik etkenlerle kasıtlı olarak bulaştırılması/ kontamine edilmesini önleme çabasıdır**.** Özellikle ABD'de sabotaja karşı önlemler zinciri olarak geliştirilmiş bir uygulamadır.

Tehlike: Sağlık bakımından olumsuz etki yaratma potansiyelidir. Tehlike fiziksel, kimyasal ya da biyolojik olabilir. Radyoaktivite maruz kalmak fiziksel tehlikedir. Biyolojik tehlikelerin çok büyük çoğunluğu mikroorganizma kaynaklıdır.

Risk: Tehlikenin gerçekleşme olasılığıdır. Basit ya da karmaşık matematiksel formüllerle hesaplanıp sayısal olarak verilebileceği gibi düşük, orta ya da yüksek gibi basitçe de ifade edilebilir.

12.03. Gıdalardaki Tehlikeler

Gıda üretim zincirinde her aşamadaki aksamalara/ ihmallere/ önemsemezliğe bağlı olarak çeşitli fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik tehlikeler bulunabilir.

12.03.01. Fiziksel Tehlikeler

Bitkisel hammaddeler hasat aşamasında taş, toprak ve nakliye sırasında çuval, tahta ya da plastik parçaları ile bulaşabilir. Ayrıca bitkiler, kendi doğal yapılarında olan sap, kabuk ve çekirdek gibi bileşenlerle beraber gıda işleme tesisine taşınır. İstenmeyen fiziksel kirlilikler hayvansal hammaddeler için de geçerlidir. Hayvansal gıdalarda temel sorun kemik parçalarıdır.

Kimi kaynaklar gıdalarda istenmeyen fiziksel parçaları doğal olanlar (örneğin vişne reçelinde çekirdek ya da piliç dönerde kemik parçası) ve doğal olmayanlar (örneğin taş ya da cam parçası) şeklinde sınıflandırırsa da bunun bir geçerliği yoktur, tümü istenmeyen materyaldir ve bunlar fiziksel tehlike olarak tanımlanırlar.

Her ne kadar, örneğin vişne reçelinde vişne sapı ile cam kırığı aynı ölçüde tehlikeli gibi görülmese de fark etmeden bunu yiyen kişinin boğazına yapışan sap, önemli yaralanmalara neden olabilir.

Gıda işletmelerinde kullanılan metal detektörler, etkin bir kontrol sağlamaktadır. Ancak tehlike yaratan diğer fiziksel bulaşanlar çoğunlukla gözle kontrol edilmektedir. Cam, en tehlikeli olanlardan birisidir ve dondurulmuş meyve sebze, klasik beyaz peynir gibi ürünün açık hatlarda işlendiği gıda işletmelerinde cam yönetimi programları vardır. Bu gibi işletmelerde, örneğin pencere camları kırılmaya dirençlidir ve/veya cam kırılsa dahi dağılmamaktadır, işletmeye hiçbir koşulda cam malzeme sokulmamaktadır. Hatta bu gibi işletmelerin laboratuvarlarında kullanılan cam malzemenin her birisine numara verilir, tartılır ve ağırlıkları kayda alınır. Cam malzemenin kırılması halinde kırık parçalar toplanıp tartılır ve kayıttaki ağırlık ile kontrol edilir. Eğer kırık parçaların ağırlığı kayıt ağırlığından daha az ise tam olarak karantina uygulanır ve eksik parçalar bulununcaya kadar laboratuvara giriş ve çıkış yapılmaz.

Gıda işletmelerinin çoğunda fiziksel kontaminasyonun önlenmesi için çalışanların küpe, kolye, yüzük, saat vb. her türlü takı ile işletmeye girmesi yasaklanır. Her ne kadar saç bonesi, koruyucu bir önlem olarak görülse de uzun

saçlar için yeterince koruma sağlamayabilir ve bu nedenle saçların olabildiğince kısa olması istenir. Benzer şekilde erkeklerde bıyık benimsenmez.

Yine fiziksel bulaşmanın engellenmesi amacı ile çalışanların iş kıyafetlerinde cep olmamalıdır. Sadece kayıt tutmakla görevli yetkili personelin kıyafetinde basit bir defter alabilecek cep bulunabilir. Bu personel, kurşun kalem değil boynuna astığı koyu mavi/ lacivert renkli tükenmez kalem kullanabilir. Benzer şekilde elinde çok basit kesik ya da yara olan tüm personel işletmede çalışırken yine koyu mavi/ lacivert renkli yara bandı kullanabilir. İşletmede metal detektör kullanılıyorsa bu özel yara bantlarının metal detektöründe yakalanabilecek düzeyde metal içeren tipleri kullanılmalıdır.

Kalemlerde ve/ veya yara bantlarında koyu mavi/ lacivert renk kullanılmasının nedeni çok genel olarak bu renkte gıda olmaması ve bu gibi materyalin işletme hattına düşerse gözle kolaylıkla fark edilebilmesidir.

İşletmeye gelen ziyaretçilerin de fiziksel bulaşmaya neden olmaması gerekir. Bu amaçla ziyaretçilerin, her türlü potansiyel fiziksel bulaşanlardan arındırılmış şekilde işletme ziyaretine izin verilir.

Gıda işletmelerinde, işletme türüne göre değişmek üzere fiziksel bulaşanlara maruz kalma potansiyeli değişiktir. Örneğin bir salça işleme hattında, son ayıklama bandından sonra fiziksel bir bulaşma olasılığı yok denecek kadar azdır. Tersine olarak, geleneksel beyaz peynir hattında paketleme aşamasında dahi fiziksel bulaşma olabilir. Dolayısıyla her gıda işletmesi, fiziksel tehlikelere karşı kendi özel önlemlerini almak durumundadır.

Fiziksel tehlikeler kimyasal tehlikelerde olduğu gibi karıştıkları gıdalarla reaksiyona girip, yeni metabolitler oluşturmadıklarından veya mikrobiyolojik tehlikeler gibi spor, toksin gibi dirençli formlar oluşturmadıkları için hassas biçimde kurgulanan sistemlerle görece daha kolay yönetilebilmektedirler.

12.03.02. Kimyasal Tehlikeler

Gıdalardaki en yaygın kimyasal tehlikeler, birincil (tarımsal hammadde) üretiminde kullanılan bitki koruma ilaçları ile bitki ve hayvan beslemesinde kullanılan hormonlar, açık denizlerde avlanan balıklar dâhil olmak üzere ağır metal kontaminasyonu ve bu su ürünlerindeki naylon/ plastik esaslı bulaşanlardır. Hormonlar ve plastikler bu kitap içeriğinin dışındadır, ancak gıda katkılarına ve bulaşanlara gıda güvenliği yaklaşımı altında bu bölümde basitçe yer verilmiştir.

Gıdaya karıştırılabilen kimyasalların sabotaj amacıyla kullanılması kimyasal tehlikelerin bir başka boyutudur.

Gıdalar çok basit bir sınıflandırma ile 3 ana grup kimyasal madde içerir. Bunlardan birincisi gıdaların yapısında doğal olarak bulunan kimyasallardır. Bunların bir kısmı karbohidrat, protein, yağ, vitamin gibi besin öğeleridir. Ancak

gıdalar doğal halleri ile de bileşimlerinde binlerce kimyasal içerirler. Bunların içinde alerjenler, doğal toksinler de bulunmaktadır.

İkinci grupta yer alan kimyasallar kalıntılar ve bulaşanlar olarak anılırlar. Gıdalara dışarıdan bulaşan veya işlem sırasında oluşan ya da birincil üretimden kalan ve gıdalarda bulunmaları istenmeyen kimyasallardır. Bulaşanlarla ilgili olarak Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (29.12.2011 tarih ve 28157 3. mükerrer sayılı Resmî Gazete) yayımlanmıştır. Bu yönetmeliğe göre nitratlar, mikotoksinler, ağır metaller, 3-monokloropropan-1,2-diol (3-MCPD), dioksinler ve dioksin benzeri poliklorlubifeniller (PCB), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve erusik asit bulaşan olarak tanımlanmıştır ve gıdalarda bulunabilecekleri maksimum miktarlar risk bazlı yaklaşımlarla belirlenmiştir.

Birincil üretimde kullanılan tarım ilaçları ve veteriner ilaçları kalıntıları ile ilgili olarak ise "Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği (R.G. 25.11.2016- 29899- Mükerrer)" ve "Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği (07.03.2017 tarih 30000 sayılı Resmî Gazete)" yayımlanmıştır.

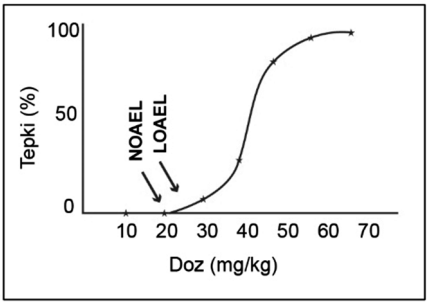
Üçüncü grup kimyasallar gıda katkı maddeleridir. Bu konuda "Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (30.06.2013)" yayımlanmıştır. Bu kodekse göre gıda katkıları " Besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeler" olarak tanımlanmakta ve gıda katkı maddelerinin son üründe bulunması amaçlanmaktadır. Gıda katkı maddelerinin gıdalarda bulunması teknolojik bir zorunluluk olarak değerlendirilmektedir. Bir başka deyişle, gıda katkı maddelerinin kullanımı için ekonomik ve teknolojik açıdan uygulanabilir başka yöntemlerle gerçekleştirilemeyecek, makul teknolojik bir ihtiyaç bulunması gerekmektedir. Gıda katkı maddelerinin (hamur kabartıcılar, asitlik düzenleyiciler, antioksidan maddeler, koruyucular vb.) mevzuatla belirlenmiş olan kurallar dâhilinde kullanımı yasaldır. Önemli olan doğru üründe gereken miktarda ve uygun saflıkta kullanılmalarıdır.

Hangi gıdada hangi katkı maddelerinin kullanılacağına uluslararası mevzuat düzenlemeleri içerisinde karar verilir. Yönetmelikte her bir gıda katkı maddesinin kullanılabileceği ürünler ve bu ürünler bazında kullanılabilecek konsantrasyonları belirtilmektedir. Gıda katkı maddeleri risk değerlendirmeleri tamamlandığında uluslararası düzeyde onaylanmakta ve onaylanan katkı maddelerine E kodu verilmektedir. E harfi "Europa" kelimesinin baş harfinden gelmekte ve gıda katkı maddesinin onaylı ve güvenli olduğunu göstermektedir.

Katkı maddelerine "E" kodu verilmesiyle, farklı katkı maddelerine farklı dillerde farklı isimler verilmesindeki kavram karmaşası son bulmuştur. Örneğin E330, sitrik asit demektir. Bu, dünyanın her yerinde aynıdır. Sitrik asit ülkemizde halk arasında yaygın olarak limon tuzu olarak anılır.

Gıda katkı maddelerinin, bulaşanların ve kalıntıların risk değerlendirmeleri bu konuda uluslararası düzeyde çalışan EFSA (European Food Safety Authority) ve JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives) tarafından yürütülmektedir. Kuruluşların web sayfalarında şeffaf bir biçimde yayınlanan "Risk Değerlendirme Raporları"na göre yine uluslararası düzeyde AB Komisyonu ve Kodeks Alimentarius Komisyonu tarafından, her bir gıda katkı maddesinin hangi ürünlerde, hangi düzeylerde kullanılabilecekleri belirlenir. Risk değerlendirmesi sürecinde katkı ve kalıntılar için hayvan denemeleri ile kısa ve uzun vadeli toksikolojik araştırmalar yapılır. Kimyasal maddenin vücuttaki emilimi, metabolizması, etkileri, dağılımı, dışarı atılması gibi konular ayrıntılı biçimde belirlenir.

Gıdalarda kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddeleri ve varlıkları tolere edilen bulaşanların deney hayvanlarında hiçbir olumsuz etkisi gözlenmeyen dozu NOAEL ile ifade edilir. Şekil 12.02'de NOAEL değeri şematik olarak verilmiştir.



Şekil 12.02. NOAEL ve LOAEL

NOAEL (No-Observed Adverse Effect Level), hiçbir olumsuz etkinin görülmediği doz olarak tanımlanır. LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect) ise en düşük olumsuz etkinin görüldüğü dozdur gıda güvenliği açısından sadece bilgi olarak kullanılır. Hayvan denemeleri ile belirlenen NOAEL değeri güvenlik faktörüne bölünerek gıda katkı maddeleri, pestisitler ve veteriner ilaçları için ADI (Acceptable Daily Intake; Günlük kabul edilebilir alım dozu) değeri hesaplanır.

$$\frac{\text{NOAEL (mg/kg Deney hayvanı vücut ağırlığı)}}{\text{Güvenlik Faktörü (100)}} = \text{ADI (mg/kg İnsan vücut ağırlığı)}$$

ADI değeri hesaplamasında güvenlik faktörü olarak genellikle 100 kullanılır. Bundan daha düşük değerlerin kullanılması kabul edilmez, ancak daha yüksek değerler (örneğin 200) kullanılarak güvenlik düzeyi artırılır. Risk grubu olarak tanımlanan yaşlılar, bebekler, hamileler ve özellikle bağışıklık yetersizliği olan hastalar için güvenlik faktörü 1000'e kadar çıkarılabilir. Buna göre, örneğin deney hayvanında hiçbir olumsuz etkinin görülmediği doz 500 mg/kg deney hayvanı

vücut ağırlığı olarak belirlendi ise insan için kabul edilebilir günlük alım miktarı standart olarak 500/100= 5 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde hesaplanır.

Hesaplanan bu değer bulaşanlar için TDI (Tolerable Daily Intake) olarak ifade edilir ve tolere edilebilir günlük alım miktarını (mg/kg vücut ağırlığı) gösterir. Bir başka deyişle gıda zincirinin herhangi bir aşamasına insanlar tarafından bilerek dâhil edilen kimyasallar için ADI değeri, gıdalarda isteğimiz dışında bulaşan kimyasallar için TDI değeri kullanılır.

12.03.03. Mikrobiyolojik Tehlikeler

Avrupa ülkeleri ve ABD'de yapılan tüketici anketlerine göre gıdalardaki en önemli tehlikeler arasında patojen bakteriler ve mikotoksinler, önem sıralamasında en önemsiz yerlerde bulunurken uzmanlar gıda kaynaklı hastalıklar arasında obeziteyi en önemli sorun olarak görmekte, bunu patojen bakteriler ve mikotoksinler izlemektedir. Her ne kadar yeryüzündeki tüm mikroorganizma türleri içinde insanlarda hastalık yapanların sayısı son derece önemsiz gibi görülmekte ise de hastalık ve ölüm ihmal edilemez.

Bu kitap kapsamında, insanlarda hastalık yapan patojenlere yeterince yer verilmiştir. Bu bölümde sadece gıda kaynaklı hastalıkların iki önemli nedeninin yetersiz ısıl işlemler (ısıtma ve soğutma) ile çapraz bulaşma olduğunun hatırlatılması ile yetinilmektedir.

12.04. HACCP ve ISO 22000

HACCP, "Hazard Analysis and Critical Control Points" kelimelerinin baş harflerinden oluşmuştur ve Türkçede "Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları" olarak kullanılmaktadır.

Gıda işletmelerinin güvenli gıda arzını sağlamak için tüm üretim zincirini takip etmesi, sorunları zamanında belirlemesi ve gerekli adımda doğru önlem alması gerekliliği üzerine kurulmuş bir gıda güvenliği sistemidir. Sorun oluştuktan sonra çözmeye değil, sorun çıkmadan önce önlemeye yönelik bir yaklaşım olduğu söylenebilir. Sistemin etkin ve düzgün kurulması için söz konusu ürün gurubu, işletme dizaynı, hammadde tedarik koşulları gibi birçok değişkenin titizlikle incelenmesi ve dikkate alınması gerekmektedir.

Amerikan Havacılık ve Uzay Ajansı (NASA) tarafından 1950'li yıllarda yürütülen uzay programında astronotların tümüyle güvenli gıda tüketmelerini sağlamak için geliştirilmiş bir gıda güvenliği sistemidir. Aynı tarihlerde ABD ilaç şirketleri tarafından yürütülmekte olan başarısızlık yolları programı esas alınmıştır. Buna göre başarısızlığa gidebilecek bütün yollar tıkanırsa sonuçta başarılı yani güvenli bir ürün elde edilir.

FDA'nın 1970'li yılların hemen başında gıdaların %23'ünün uygunsuzluğunu belirtmesinden hemen sonra yine FDA tarafından 1976'da başta sebze

konserveleri olmak üzere düşük asitli gıdalarda *Cl. botulinum* tehlikesine karşı yasal düzenleme olarak HACCP uygulaması başlatıldı. ABD'de bu uygulamanın başarılı olması üzerine başta AB olmak üzere ve Türkiye de dâhil pek çok ülkede HACCP programı yasal zorunluluk haline getirildi.

AB ülkelerinde ve dolayısıyla Türkiye'de HACCP uygulaması bir süre devam etti. Bu süreçte başta ordu olmak üzere kamu tarafından yapılan gıda ihalelerinde, iç ve dış ticarette HACCP belgesi istendi. Yabancı tur operatörleri, Ege ve Akdeniz'deki büyük otellere yabancı turist getirmek için bu otellerin mutfaklarında HACCP belgesi olmasını şart koştu.

Bu gibi uygulamaların çok hızlı bir şekilde yaygınlaşması üzerine buna paralel olarak çok sayıda HACCP belgelendirme şirketi kuruldu.

Bir gıda işletmesinde HACCP programının uygulanması, eğitimlerinin verilmesi, dokümantasyon ve HACCP kurallarına uygun üretim yapıldığının kanıtı olan belgenin verilmesi özel şirketler tarafından yürütülmektedir, ancak bu şirketlerin yetkinliğini denetleyecek ve bu programın yürütülmesi için izin verecek bir üst yetkili yoktur. Buna dayanarak AB ülkelerinde konu üzerinde hiçbir yetkinliği olmayan şirketlerin kurulduğu görüldü. Giderek bazı şirketlerin hiçbir eğitim dahi vermeden gıda işletmelerine HACCP sertifikası verdiği ortaya çıktı.

Bunun üzerine AB ülkelerinde HACCP sertifikasyonunun önemi giderek azaldı ve ticarette BRC (British Retail Consortium), IFS (International Food Standard) vb. sertifikalar geçerli kılınmaya başladı. Bir süre sonra AB ülkeleri ISO 22000 programına geçti. Böylece bir anlamda HACCP, "Avrupalılaştırıldı" ve özellikle temel sorun olan yetkilendirme konusu çözüldü. Günümüzde ISO 22000 sertifikasyonu ISO tarafından yetkilendirilmiş kuruluşların denetimi altında yapılmaktadır. ISO 22000, HACCP ilkelerini tümüyle benimseyen bir standarttır. Günümüzde ABD ve bazı ülkelerde halen HACCP belgelendirme sistemi geçerlidir ve AB ülkelerindeki uluslararası ticarette bazen BRC, IFS vb. belgelendirmeler talep edilmektedir.

Bir gıda işletmesinde ISO 22000 sisteminin kurulması bir seri adım ile yapılır.

İlk olarak HACCP/ gıda güvenliği ekibi oluşturulur. Bu ekipte öncelikle teknik açıdan yetkin personel bulunur. Ekip lideri gıda güvenliği yönetim sisteminde deneyimli olmalıdır. Sonra üründe kullanılan hammaddeler, yardımcı maddeler, ürün ile temas eden tüm materyal, son ürün ve ürünün hedeflenen kullanım şekli açık bir şekilde tanımlanır. Ardından ayrıntılı bir akış şeması hazırlanır ve akış şemasının doğru ve işler olduğu yerinde kontrol edilir. Peynirin mayalanması gibi bekleme işlemi varsa sıcaklık ve bekleme süresi bu şema üzerinde gösterilir.

Bir sonraki adım ürüne ilişkin tüm potansiyel tehlikelerin ve risklerin belirlenmesidir. Her tehlike riski ile birlikte ifade edilmelidir. Bu aşamada tehlikelerin kontrol önlemleri dikkate alınmalıdır. Tehlike analizi, HACCP uygulamasındaki 7 temel ilkeden (prensipten) birincisidir.

HACCP planında 2. ve 3. ilkeler sırası ile kritik kontrol noktalarının (KKN) tanımlanması ve bu noktalar için kritik limitlerin belirlenmesidir. ISO 22000'de bu 2 ilke, tehlike kontrol planı içinde değerlendirilir. Kritik limitler, ısıl işlem, soğutma, pH, ışınlama, koruyucu ilavesi olabilir. Isıl işlem ve soğutma, her koşulda süre ile birlikte ifade edilir.

İzleyen adım, HACCP planlarının 4. ilkesi olup her KKN'sında izleme sisteminin kurulmasıdır. Bunu 5. HACCP ilkesi olan düzeltici işlemler izler. Sonrasında 6. HACCP ilkesi olarak HACCP planının doğru ve etkin çalıştığının kontrolü ve onayı vardır. Uygulamada en son olarak 7. HACCP ilkesi olan kayıt tutma vardır.

ISO 22000/ HACCP uygulamasında aşağıdaki tanımlar da önemlidir.

Kritik kontrol noktası: Kontrol altına alındığında tehlikenin kaldırıldığı işlem basamağıdır. Bu basamakta kontrol bir an için dahi gözden kaçırılsa tehlikenin gerçekleşme şansı çok yüksektir. Kritik kontrol noktaları, HACCP sistemi denetimi altındadır.

Ön gereksinim programı: Gıda zinciri boyunca gerekli hijyenik ortamı sağlayarak uygun biri üretim yapmak, son ürünün güvenli bir şekilde hazırlanmasını sağlamak ve insan tüketimi için güvenli gıdalar sunmak için temel koşullar ve faaliyetler. Ön gereksinim programı kapsamında, gıda işleme yerlerinin tasarımı ve yapı malzemesi ile ilgili gereksinmeler, ambalajlama, taşıma ve depolama ile ilgili gereksinmeler, ekipman ve makine ile ilgili gereksinmeler, personel ve kişisel hijyen ile ilgili gereksinmeler, sanitasyon ve haşere kontrolü ile ilgili gereksinmeler ve fiziksel kontaminasyonun önlenmesi ile ilgili gereksinmeler karşılanmış olmalıdır.

Operasyonel ön gereksinim programı (O-ÖGP): Olası gıda güvenlik tehlikelerini kontrol altına almak için tehlike analizleriyle tanımlanan ön gereksinim programı üretim kontrolü, izleme sistemi, analizler, spesifikasyonlar, ürün geri çağırma, dokümantasyon, hijyen, temizlik işlemleri, atıkların kontrolü, zararlılarla mücadele, bakım ve kalibrasyon, personel hijyeni, personel ve ziyaretçilerin uyması gerekli kurallar, taşıma, depolama, ürün bilgisi, etiketleme, tüketici bilgilendirme, eğitim, temel GMP önlemleri, tesis yerleşimi, üretim teçhizatı özellikleri ve iş akışlarını güvenceye alır.

Doğru (iyi[1]) Üretim Uygulamaları (GMP; Good Manufacturing Practices): Gıda işletmesinde kazanılan deneyimler, tasarım ve yapısal olanaklar yanında işleme, depolama, sanitasyon, kontrol işlemleri de dahil olmak üzere işletmeyi tüm yönleri ile ele alır. cGMP Current (Güncel) GMP anlamındadır ve diğer kalite yaklaşımları ile ilişki kurar. Doğru üretim uygulamaları, insan sağlığının olumsuz bir şekilde etkilenmemesi için belirlenen koşul ve standartlarda üretimin ilk

[1]Good Manufacturing, Practice, Good Laboratory Practice gibi İngilizce deyimlerdeki "Good" kelimesi Türkçede "İyi" olarak kullanılmaktadır. Oysa "Good" kelimesi Türkçede "Doğru" olarak kullanılmalıdır.

basamağından son basamağına kadar bütün süreçlerin güvenirliğini artırmayı hedefler. Bina, makine ve ekipmanların standardının sağlanması, kalite kontrollerin yapılması, organizasyon yapısının kurulması, iş süreçlerinin esasları ve dokümantasyonu gibi temel ilkeleri içermektedir.

Ürününün geri çağrılması (Recall): Pazara verilmiş gıdada, daha sonra saptanan bir tehlike ya da kabul edilenin üzerinde risk belirlenirse ürünün, tercihen müşteriye ulaşmadan pazardan toplanması işlemidir. Önemsiz etiket bilgisi hataları nedeni ile ürünün pazardan toplanması geri çağırma değildir. AB içerisinde geliştirilmiş olan RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed; Gıda ve Yemde Hızlı Alarm Bildirimleri), gıda zincirinde tespit edilen bir gıda güvenliği sorunu ile ilgili hızlı önlem alabilmeyi hedeflemektedir.

İzleme/ izlenebilirlik: İzlenebilirlik, basitçe kayıt tutma zorunluluğudur. Gıda işletmeleri, gıda zinciri boyunca ürünün ve içerisindeki herhangi bir bileşenin izini sürebilmelidir. Bunları sağlayan bir sistem olmasının yanı sıra izlenebilirlik, hayvan yemleri ve/ veya gıda katkı maddelerinin üretim, dağıtım ve depolanmalarını takip eden bir sistemdir. Böylece insan sağlığı üzerinde risk oluşturabilecek bir ürünün kaynağı dâhil olmak üzere ileriye ve geriye dönük olarak hangi şartlarda ve kimler arasında el değiştirerek geldiği tespit edilmektedir.

ISO 22000 standardı, HACCP planı ile ön gereksinim programlarını birleştirmektedir. Böylece bu standardın amacı, küresel seviyeye sahip gıda zincirinde, gıda güvenliği yönetim koşullarına uyum sağlamaktır. Bu standart, gıda güvenliğinin sağlanması için temel olarak kabul edilen öğeleri içerir.

İnteraktif iletişim, bütün potansiyel tehlikelerin saptanması ve kontrollerin sağlanması için gıda zinciri boyunca en alt kademeden en üst kademeye kadar sağlanmalıdır. Etkili bir iletişimin sağlanması için her kademede yer alan kuruluşun, pozisyonunu ve görevini bilmesi gerekir (Şekil 12.03).

Şekil 12.03. ISO 22000'de interaktif iletişimin yeri

12.05. Risk Analizi

Gıda ile ilgili tüm işlemlerin, insan sağlığı ve yaşamının en üst düzeyde korunmasının sağlanabilmesi için risk analizine dayanılması zorunludur. Risk değerlendirme, risk yönetimi ve risk iletişimi olmak üzere birbirine sınırlı olarak bağlı ancak genel olarak bağımsız olan üç adımdan oluşan risk analizinin amacı sağlık risklerini önlemek, ortadan kaldırmak veya kabul edilebilir seviyeye

indirmektir. Risk analizi, sağlığı korumak amacıyla yapılması gereken eylemlerin amaca uygun, etkin ve gereği kadar olmasını sağlayan sistematik bir metodolojidir. AB genel gıda yasalarının temelini oluşturan bu 3 bileşen şekil 12.04'te verilmiştir.

Şekil 12.04. Risk analizinin 3 bileşeni

Risk kavramı, gıdadaki tehlikelerin olumsuz bir etki oluşturması olasılığının ve büyüklüğünün bir fonksiyonudur. Gıda güvenliği sistemleri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, gerçekte ve algılanmakta olan gıda güvenliği sorunlarına cevap olarak hem kamuda hem de özel kalite kontrol sistemlerinde giderek daha katı hale gelmektedir

Gıda güvenliğinde düzenleyici sistemler, gıdaya yönelik yeni riskleri ele alırken *Listeria monocytogenes*, patojenik *Salmonella* serotipleri ve *E. coli* O157:H7 gibi mevcut riskleri de iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Risk analizi çerçevesinde gıda güvenliği düzenlemesi için bilimsel gerekçe, insan sağlığına yönelik risklerin değerlendirildiği ve kontrolleri için en iyi tanımlamaların yapıldığı yapısal bir yaklaşım içinde değerlendirilir.

Risk Değerlendirmesi (Bilimsel): Belirli bir gıda kaynaklı tehlikeyle ilişkili insan sağlığı riskinin değerlendirilmesidir. Risk değerlendirmesi, mevcut bilimsel kanıtlara dayanmalı ve bağımsız, tarafsız ve şeffaf bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Bilimsel tavsiye ve bilgi analizine dayanmaktadır. Tehlikenin belirlenmesi, tehlike karakterizasyonu, maruziyetin değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu olmak üzere dört basamaktan oluşan bir süreçtir. Maruziyet değerlendirmesi, potansiyel tehlike ile karşılaşma sıklığını (maruziyet) ve hangi düzeyde olduğunu (doz) inceleyen bir süreçtir.

Risk Yönetimi (Politik): Kabul edilebilir risk seviyesi ve bu riskin kontrolü için uygulanacak önlemler konusunda kararlar alınır. Riskin azaltılması için belirli

önlemlerin belirlenmesi, değerlendirilmesi ve seçilip uygulanmasını içerir. Risk değerlendirmesinden farklı olarak, ilgili taraflara danışılıp uygun kontrol ve önlem seçeneklerinin ve alternatiflerinin ele alındığı süreçtir. Tüm veriler doğrultusunda riski yönetmek için mevzuat çalışması yapılır ve gerekli kuralları yayınlanır, belirlenen kurallara uyulup uyulmadığı denetlenir, gerekirse denetimler dışında izleme programları oluşturulur. Risk değerlendirmesi için verilerin yetersiz olduğu, belirsizliğin sürdüğü, ciddi ve geri dönüşü olmayan durumlarda kararlar, ihtiyatlılık ilkesine dayanarak verilir.

Risk değerlendirmesi ve risk yönetimi bilimsel anlamda güvenilirliğin sağlanması için tam anlamıyla ayrılmalıdır. Risk değerlendirmesinin sonuçları risk yönetiminin dayanak noktasıdır.

Risk İletişimi: Risk analizi sürecinde risk değerlendiricileri, risk yöneticileri ve diğer ilgili tarafların, tehlike, risk, riskle ilgili faktörler ve riskin algılanmasına ilişkin bilgi ve görüşler ile risk değerlendirmesi bulguları ve risk yönetimi kararlarının açıklamalarını da kapsayan bilgi ve düşüncelerin paylaşımıdır.

12.06. Engeller Teknolojisi

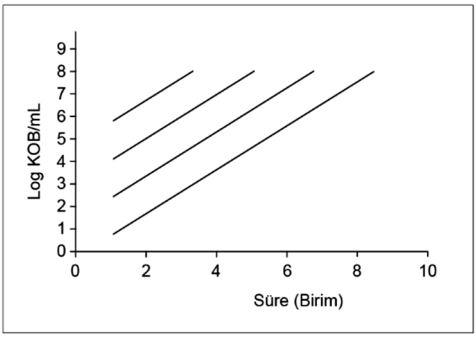
Güvenilir bir gıda üretimi için patojen mikroorganizmaların tümüyle yok edilmesi ya da kabul edilir sayılara indirgenmesi gerektiği açıktır. Gıda israfının önüne geçilmesi ve devamında ekonomik kayıpların azaltılması için saprofitlerin sayısının da gıdanın raf ömrü boyunca bozulmaya neden olmayacak şekilde indirgenmesi gerekir. Mikroorganizma indirgeme yöntemleri, bu kitabın 03. Mikroorganizma İndirgemesi bölümünde verilmiştir.

Steril gıdalarda tüm mikroorganizmalar yok edildiği için patojen riski yoktur ve saprofitlerin gelişerek gıdayı bozması söz konusu değildir. Steril gıdalarda raf ömrünü belirleyen faktör, başta enzimatik reaksiyonlar olmak üzere duyusal kaliteyi olumsuz şekilde etkileyen kimyasal değişmelerdir.

Bazı teknolojik uygulamalarda tek bir indirgeme yöntemi kullanılırken (örneğin sütün pastörizasyonu) bazı uygulamalarda birden fazla yöntem kullanılır (örneğin geleneksel hıyar turşusunda yüksek asitlik ve yüksek tuz derişimi).

Engeller teknolojisi basitçe, birden fazla mikrobiyolojik indirgeme yönteminin kullanılması olarak tanımlamaktadır. Bu kombine uygulama ile ayrı ayrı yapılan birden fazla indirgeme yönteminin etkisi artırılır. Kimi kaynaklarda birleşik koruma olarak da tanımlanır.

İçme sütünün pastörize edildikten sonra soğukta saklanmasında da iki ayrı uygulama bulunmaktadır. Patojenlerin imhası göz ardı edilmek kaydı ile çiğ sütün tek başına soğutulması raf ömrünü uzatır. Çiğ sütteki başlangıç bakteri sayısı ne kadar düşük ise sadece soğutarak raf ömrünün o denli uzayacağı açıktır. Şekil 12.05'te temsili olarak başlangıç bakteri sayısı ile raf ömrü arasındaki ilişki gösterilmiştir.



Şekil 12.05. Başlangıç bakteri yükü ile raf ömrü arasındaki ilişki

Şekil 12.05'te sütte bakteri sayısının 10^8 KOB/mL'ye eriştiğinde bozulduğu yani raf ömrünün tamamlandığı kabul edilmiştir. Pastörizasyon ile çiğ sütte bulunan bakteri yükü düşürülerek raf ömrü uzatılmıştır. Pastörize edilen çiğ süt oda sıcaklığında bırakılırsa raf ömrü azalır. Bu uygulamada sütün pastörizasyonu bakteri indirgeme yöntemidir, ancak soğutmanın böyle bir indirgeme etkisi yoktur. Soğutma sadece gelişmeyi yavaşlatarak pastörizasyonun etkisini kuvvetlendirir.

Engeller teknolojisi asıl olarak, iki bağımsız uygulamadaki indirgeme miktarının kombine uygulama ile artmasıdır. Çok basit bir örnekle, tek başına asitlendirme 4 birim, tek başına tuz ilavesi 3 birim indirgeme sağlıyorsa ve asitlendirme ile tuz ilavesi beraberken 6 birim indirgeme sağlayabiliyorsa burada bir sinerjik etkiden bahsedilebilir. Bu örnekte sinerjik etki olduğunun gösterilmesi için >(4+3) olması şart değildir, >4 sonuç yeterlidir ve eğer 5 birim koruma yeterli ise asitlik ve/ veya tuz ilavesi düşürülerek istenen koruma sağlanabilir. Kimi uygulamalarda (A) engeli 4 ve (B) engeli 3 birim indirgeme sağlarken (A+B) kombinasyonunda >7 indirgeme sağlanabilir ve engeller teknolojisinde asıl hedef budur.

Her ne kadar etin tuzlanıp kurutulması, turşu ve sucuk yapımı vb. geleneksel gıda koruma yöntemlerinde de birden fazla engel kullanılıyorsa da özellikle gelişmiş ülkelerdeki tüketicilerin kimyasal gıda koruyucular yerine başta baharat olmak üzere doğal koruma yöntemlerini tercih etme eğiliminin artması, gıda güvenliğinde çıtanın sürekli olarak yükseltilmesi ve ekonomik nedenlerle gıdaların raf ömrünün uzatılması engeller teknolojisine yeni boyutlar getirmiştir.

Günümüzde engeller teknolojisinde 2 farklı yaklaşım vardır.

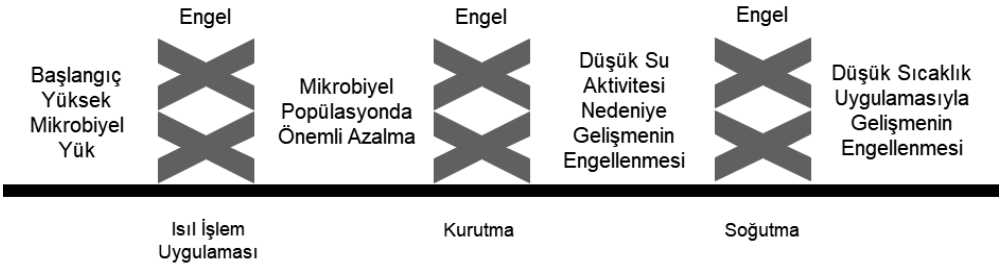
-Kimyasal gıda koruyucularının olabildiğince azaltılarak zaten yüksek olan gıda güvenliğinin devamının sağlanması. Bu yaklaşım, gelişmiş ülkelerde hedeflenmektedir.

-Kimyasal gıda koruyucularına ilaveten diğer engellerin de kullanılarak düşük olan gıda güvenliğini makul düzeye çıkartmak. Bu yaklaşım gelişmekte olan ülkelerde benimsenmektedir.

Gıda korumada kullanılan engellerden düşük sıcaklık, düşük redoks potansiyeli ve düşük nem miktarında başta yetersiz depolama koşullarına bağlı olarak her zaman kırılmalar olabilir. Ancak yüksek asitlik gibi engellerin çok büyük çoğunluğu raf ömrü boyunca stabil kalır.

Engeller teknolojisinde kullanılan başlıca engeller yüksek asitlik, düşük nem, düşük redoks potansiyeli (vakum), başta laktik asit bakterileri olmak üzere rekabetçi floranın oluşturduğu bakteriyosinler, düşük sıcaklık, yüksek kalitede hammadde kullanımına bağlı ve/veya ısıl işlem ya da ışınlama vb. uygulamalar ile başlangıç mikroorganizma sayısının düşük olması ve tuz ile şeker dâhil olmak üzere tüm kimyasal gıda koruyucularıdır. Son zamanlarda şeker ve tuz, sağlık nedenleri ile günlük diyetlerden olabildiğince uzaklaştırılmaktadır.

Şekil 12.06'da engeller teknolojisi şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil 12.06. Engeller teknolojisinin şematik gösterimi

Günümüzde engeller teknolojisinde uygulanan potansiyel engellerin sayısı 100'den fazladır ve baharat başta olmak üzere çeşitli bitkilerin kendileri ve/ veya ekstraktları üzerinde çalışmalar yoğun şekilde devam etmektedir. Kuşkusuz gıda güvenliğini sağlamak amacıyla bitki materyali kullanımlarında, alerjik reaksiyonlara neden olmaması, kullanıldığı gıdanın duyusal niteliklerinde kayıplara yol açmaması, bitki materyalinin her zaman aynı fitokimyasal nitelikte sağlanması ve ekonomik faktörler her koşulda dikkate alınmaktadır.

Gıda üretiminde uygulanan tüm teknolojik işlemler, depolama ve dağıtım sırasında kullanılacak engellerin seçimi de engeller teknolojisi için önemlidir. Seçilen uygulamalar her gıda maddesi ve her hedef mikroorganizma için farklılık gösterir. Bu nedenle soğuk zincir altında koruma ve/veya modifiye atmosfer paketleme gibi işlemler her ürün için ISO 22000/ HACCP prensipleri ile birlikte ele alınmalıdır.

12.07. Soğuk/ Donmuş Zincirde Kırılma

Bir gıdadaki mikroorganizmaların ve biyokimyasal değişmelerin yavaşlatılması soğutma ile, bunların tümüyle durdurulması[2] ise dondurma ile sağlanır. Buzdolabının sıcaklığı ne kadar düşükse o denli etkili bir koruma gerçekleşir (bknz ⇒ Şekil 12.05). Soğutma uygulaması, mikroorganizmaların çoğalma hızını yavaşlatır. Endüstriyel olarak dondurma sıcaklığı -18 °C'tır.

[2] Lipazlar -30 °C'a kadar faaliyetlerini sürdürürler

Soğutma ve kurutma, bilinen en eski ve geleneksel gıda muhafaza yöntemleri olsa da özellikle soğutulmuş ve dondurulmuş gıdalarda depolama ve nakliye aşamasında çeşitli kırılmalar olabilmektedir. Bu kırılmalar, gıda güvenliğini olumsuz etkileyebilir. Bu olumsuzlukta mikrobiyolojik açıdan 3 temel faktör etkili olabilir:

-Kırılmanın büyüklüğü ve süresi,

-Gıdanın bileşimi,

-Gıdada psikrofil ve psikrotrof bakteri yükü.

Konuya sadece mikrobiyolojik açıdan bakıldığında, dondurulmuş bir gıdanın sıcaklığı zincirdeki kırılma nedeni ile -5 ^{o}C'a yükselirse henüz bir tehlike yoktur. Psikrofil karakterli bakteriler dahi bu sıcaklıkta gelişemezler. Hatta -3 ^{o}C dahi güvenli sayılabilir. Soğutulmuş gıdalarda ise 1 ^{o}C sıcaklık artışı dahi etkili olur. Kırılmışlıktaki süre de önemlidir. Soğutulmuş bir gıdada 1 ^{o}C artışta 4 saat bekleme ile 5 ^{o}C'lık artışta 15 dakika beklemek aynı şey değildir ve uzun süreli kırılmalar daha fazla olumsuzluğa neden olur.

Kuşkusuz gıdanın düşük nem içeriği (A_s), yüksek asitliği, koruyucu madde içeriği gibi faktörler de soğutulmuş gıdalarda soğuk zincir kırılmalarına karşı engeller teknolojisi yaklaşımı ile kırılma tehlikesinin azalmasına etkili olur. Gıdanın fiziksel kütlesi de etkili bir faktördür. Büyük hacimli gıdalarda ısınma ve soğuma daha geç olur.

Soğutulmuş gıdanın psikrofil ve/veya psikrotrof bakteri yükü de soğuk zincir kırılmalarında önemlidir. Doğal olarak bu grup bakteri yükü fazla olan gıdalar, soğuk zincir kırılmalarına karşı daha duyarlıdırlar.

Görüldüğü gibi özellikle soğuk zincir kırılmalarındaki mikrobiyolojik risk artışı, basit bir matematik formülle açıklanamayacak kadar karmaşıktır. Gıda sanayisinde gerek depolama gerek nakliye ve gerek pazarlama sırasında soğuk ve donmuş zincir kırılmalarının önüne geçilmesi mutlak zorunluluktur. Bu kırılmalar, patojenlerin sayısında artışa yol açabileceği gibi daha yaygın olarak psikrofil ve psikrotrof saprofitlerin sayısında artışa neden olur ve üründe ekonomik kayıplara yol açabilir.

Hatırlatma

Gıda kaynaklı hastalıkların başlıca 2 nedeni çapraz bulaşmalar ile yetersiz ısıl işlemdir (yetersiz soğutma ve yetersiz ısıtma). Bu 2 faktöre asgari ölçüde dikkat edilirse gıda kaynaklı hastalanmalar çok önemli ölçüde indirgenir.

Özellikle sıcak yenilmesi gereken etli yemekler asla ısıtılmaz, ancak "en az bir taşım" kaynatılır, sonra yeme sıcaklığına soğutulur. Akılda kalması için: Matemlerde bayrak asla yarıya çekilmez, tam çekilir ve yarıya indirilir.

Soğuk yenilmesi gereken sütlü tatlılar gibi riskli gıdaların servis anında sıcaklığı 6 ^{o}C üzerinde olmamalıdır.

Kontamine su ile sulanmış ve/veya yıkanmış doğrudan tüketilen gıdalar (yeşil yapraklı salatalar, meyveler vb.) her zaman risklidir.

Kreşler ve yaşlı bakım evleri gibi yeterli hijyen uygulaması sağlanamayan ortamlarda enterik patojenler, diğer bireylere ve onlardan da ebeveynlere bulaşır, ancak bu konu gıda mikrobiyolojisi değil, genel hijyen uygulama kurallarını ilgilendirir.

13. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLERDE METOTLARIN GEÇERLİ KILINMASI VE DOĞRULANMASI

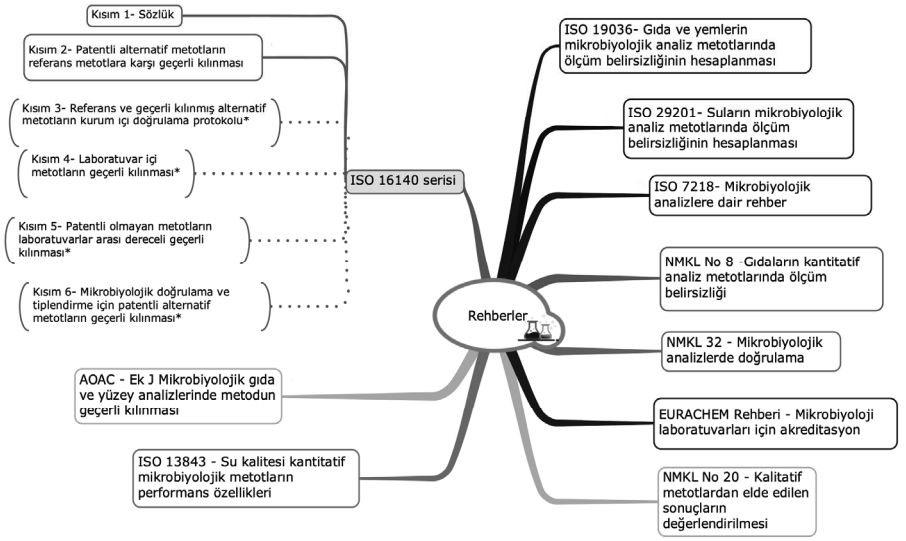
**Doç. Dr. Aysun YILMAZ, Dr. Gülay YILDIRIM,
Dr. Burcu ÇAKMAK SANCAR, Dr. Perihan YOLCI ÖMEROĞLU**

13.01. Genel Bilgiler **446**
13.02. Metotların Geçerli Kılınması **448**
13.02.01. Gıda Numuneleri Mikrobiyolojik Analizlerde Geçerli Kılma 448
13.02.01.01. Kalitatif Metotlar 448
13.02.01.02. Kantitatif Metotlar 459
13.02.02. Su Numuneleri Mikrobiyolojik Analizlerde Geçerli Kılma 468
13.02.02.01. Kategorik Performans Özellikleri 469
13.02.02.02. Maksimum Üst Limitin Belirlenmesi ve Alt Limitinin Değerlendirilmesi 471
13.02.02.03. Kesinliğin Değerlendirilmesi: Tekrarlanabilirlik ve Tekrarüretilebilirliğin Hesaplanması 474
13.02.02.04. Sağlamlık 479
13.02.02.05. Bağıl Geri Kazanım 480
13.03. Metotların Doğrulaması **480**
13.03.01. Gıda, Yem ve Çevre Numunelerinde Mikrobiyolojik Analizlerde Doğrulama 480
13.03.01.01. Kalitatif Metotlar 481
13.03.01.02. Kantitatif Metotlar 483
13.03.02. Su Numunelerinde Mikrobiyolojik Analizlerde Doğrulama 489
13.03.02.01. Hassasiyet, Spesifiklik, Verimlilik, Seçicilik, Yanlış Pozitif Oranı, Yanlış Negatif Oranı 490
13.03.02.02. Tekrarlanabilirlik 491
13.04. Numunelere Mikroorganizma İnokülasyon Yöntemleri **493**
13.04.01. Karışımla Kirletme 493
13.04.02. Ekim-Üretme Prosedürü 494
13.04.03. Kirletme Prosedürü 495
13.05. Geçerli Kılma ve Doğrulama Çalışmalarında Kullanılan Gıda Kategori ve Ürünleri **496**
Bu Bölüme ait Kaynaklar **499**

13.01. Genel Bilgiler

Mikrobiyolojik analizler kimyasal ve fiziksel analizlerde olduğu gibi temel olarak numune hazırlama, analiz, verilerin değerlendirilmesi ve doğrulama gibi bir dizi basamaktan oluşmaktadır. Bu basamakların doğru şekilde uygulanması güvenilir sonuçların eldesi için çok önemli olup analiz sonuçlarının doğruluğu kullanılan metodun performansı ile yakından ilişkilidir. Laboratuvarlarda kullanılan metotların *geçerli kılınması (validation)*, metodun kullanım amaçlarına uygunluğunun belirlenmesi ve performansının objektif delillerle ortaya konulması amacıyla yapılan bir dizi ölçüm ve değerlendirmeler bütünüdür. *Doğrulama (verification)* ise performans özellikleri belirlenmiş metotların kullanıcı laboratuvar şartlarında çalıştığının teyit edilmesidir.

Bu bölümün amacı, gıda ve suların mikrobiyolojik analizlerinde kullanılan metotların geçerli kılınması ve doğrulaması ile ilgili rehberler ve içerikleri hakkında bilgi vermektir. Konu ile ilgili birçok kaynak ve standart bulunmakta olup bu bölüm hazırlanırken ülkemizde en yaygın kullanılanları temel alınmıştır (Şekil 13.01). Gıda zinciri için geçerli kılma ilkelerinin anlatıldığı ISO 16140 serisi henüz tamamlanmamış olup hazırlık aşamasında olan standartlar Şekil 13.01'de noktalı şekilde belirtilmiştir.



Şekil 13.01. Geçerli kılma, doğrulama ve ölçüm belirsizliği ile ilgili kullanılan bazı standart ve rehberler.

Mikrobiyolojik analiz sonucuna göre kalitatif (var/yok - nitel) ve kantitatif (nicel) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Metotların geçerli kılınması ve doğrulaması basamakları da bu iki gruba göre ayrı performans özelliklerinin değerlendirilmesini gerektirir. Aşağıda gıda ve su analizleri için kalitatif ve kantitatif metotların performans özellikleri tariflenmiştir. Rutin kullanımda laboratuvarlar çoğunlukla standart metotların kullanımını tercih ettiklerinden sadece doğrulama basamağının uygulanması yeterli olacaktır. Bununla birlikte laboratuvar çalışanlarının geçerli kılma aşamalarını bilmesi ve gerektiğinde geçerli kılma raporlarının değerlendirebilmesi için bu kısımda detaylı olarak anlatılmıştır.

Metot geçerli kılma çalışmaları metodun kullanım amacına göre tek ya da iki basamaktan oluşabilir. Bu basamaklar, metodu geliştiren kurumun kendisi tarafından yapılan ya da dışarıda başka bir laboratuvardan hizmet alınarak yaptırılan kurum içi geçerli kılma çalışması ve laboratuvarlar arası kolaboratif çalışma (işbirliği) sonucu metodun uluslararası kabul görmüş protokollere göre yapılan geçerli kılma çalışmasıdır.

Bu bölümde ilgili standardın metot karşılaştırma çalışması, yani kurum içi geçerli kılma bölümü aktarılacaktır. Laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışması ile ilgili bilgilendirmeye yer verilmemiştir.

Laboratuvarda kullanılan metotlar NMKL No 32 rehberinde aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır:
1- Standart metotlar - Performans özellikleri, uluslararası kabul görmüş protokollere göre geçerli kılınmış (kolaboratif çalışma dâhil), metot geliştirme kurumları tarafından yayınlanan metotlar,

2- Alternatif metotlar - Uluslararası kabul görmüş protokollere göre (kolaboratif çalışma dâhil) geçerli kılma çalışmaları yapılmış metotlar,

3- Performans özellikleri belirlenmiş ancak kolaboratif çalışması olmayan standartlaştırılmış ve/veya yasal metotlar,

4- Performans özellikleri belirlenmemiş standartlaştırılmış metotlar,

5- Kurum içi metotlar.

İlk ve ikinci sırada yer alan geçerli kılınmış metotların performans özellikleri rutin kullanım sırasında farklı laboratuvarlarda bulunan değişkenlerden (analist, ekipman vb.) etkilenebileceği için kullanım öncesi kontrol edilmelidir. Standartlaştırılmış olan üçüncü ve dördüncü gruptaki metotlar için karşılaştırıldıkları metotların performansı ile daha detaylı bir tamamlayıcı değerlendirme yapılmalıdır. Son grup olan kurum içi metotlar, tam geçerli kılma çalışması gerektirmektedir [1].

13.02. Metotların Geçerli Kılınması

Metotların geçerli kılınması başlığı altında iki ayrı standart ile ilgili bilgilendirme yapılmıştır. Geçerli kılma çalışmaları, gıdalarda ISO 16140-2 standardı, sularda ISO 13843 standardı üzerinden aktarılmıştır. Verilen örnekler ilgili standartlarda yer alan örneklerdir [2, 3].

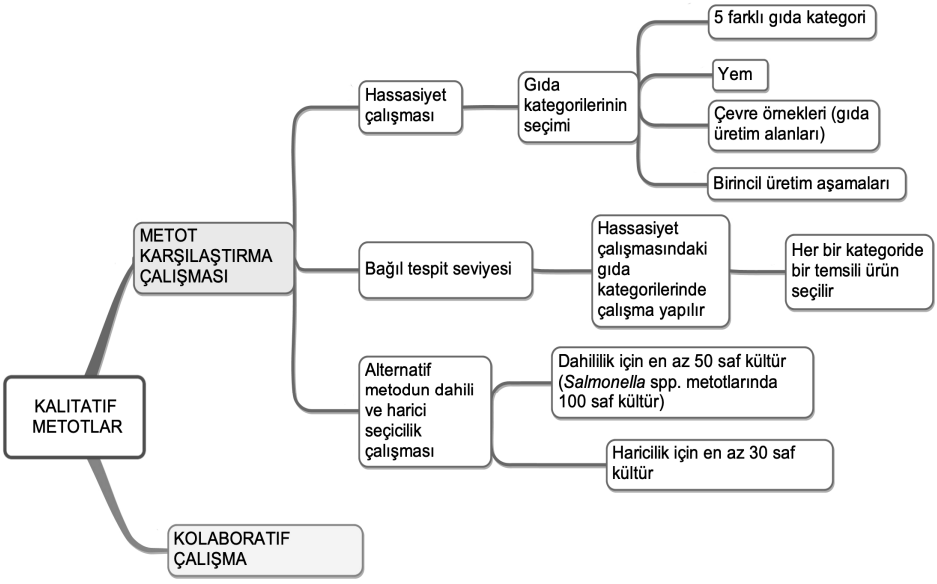
Gıda ile ilgili çalışmalarda kullanılacak olan numune kategorileri ve bu kategorilerde yer alan numune tipleri ISO 16040-2 standardında belirtilmiştir. Kategori denildiğinde aynı orijinden gelen, örneğin çiğ süt ve süt ürünleri, ısıl işlem görmüş süt ve süt ürünleri, çiğ et ve pişmeye hazır et ürünleri (kanatlı hariç), yemeye hazır ve yeniden ısıtmak için hazırlanmış et ürünleri gibi gıda grupları anlaşılmalıdır. Gıda tipi denildiğinde benzer şekilde üretilen, aynı mikrobiyel özelliklere sahip olan ve bir kategori altında yer alan ana gıda grupları anlaşılmalıdır. Örneğin, çiğ süt ve süt ürünleri kategorisinde iki ayrı grup gıda tipi tanımlanmıştır. İlk grup gıda tipi, çiğ süt ve/veya ısı işlem görmemiş fermente/ asidifiye sütleri; ikinci grup gıda tipi, yüksek yağ içerikli ve/veya yüksek sayıda doğal floraya sahip, çiğ sütten elde edilen ürünleri kapsamaktadır. Tabloda aynı zamanda her bir gıda tipi için temsili numuneler belirtilmiştir. Temsili numune tek bir spesifik gıda, yem, birincil üretim veya çevre örneğidir. Bu standart yanında NMKL No 32'de doğrulama amaçlı kategori ve tipleri temsil edecek numuneler tablo halinde sunulmuştur. Bu tabloda gıda tipleri ayrı bir şekilde verilmemiş, sadece kategori ve temsili ürünler belirtilmiştir. Aynı tablo ülkemizde bilinen ürünler dikkate 13.05. bölümde okuyucuya sunulmuştur [1, 2].

13.02.01. Gıda Numuneleri Mikrobiyolojik Analizlerde Geçerli Kılma

Gıda zincirinde kullanılan referans metotlara karşı geliştirilen alternatif metotların geçerli kılma çalışmaları ISO 16140-2 standardında anlatılmıştır. Standart, özellikle bakteri ve küf analizlerinde kullanılmak üzere oluşturulmuş olmakla birlikte içindeki bazı bölümler diğer mikroorganizmalar veya metabolitleri için de uygulanabilir. Standardın kapsamı insani tüketim, hayvanların beslenmesi, gıda ve yem üretim alanlarındaki çevresel numuneler ve birincil üretim alanlarındaki numuneleri içermektedir. Aşağıda standardın içeriği kalitatif ve kantitatif metotlar olmak üzere belirtilmiştir [2].

13.02.01.01. Kalitatif Metotlar

Kalitatif metotlar ölçüm sonucunun var/yok olarak elde edildiği metotlardır. Standart içinde kurum içi geçerli kılma basamağı alternatif metot ile karşılaştırmayı içerdiği için metot karşılaştırma çalışması olarak belirtilmiştir. Kalitatif metotlarda geçerli kılma çalışması *hassasiyet*, *bağıl tespit seviyesi*, *dâhililik* ve *haricilik* çalışmalarından oluşmaktadır. Aşağıda Şekil 13.02'de geçerli kılma parametreleri şematize edilerek okuyucuya sunulmuştur.

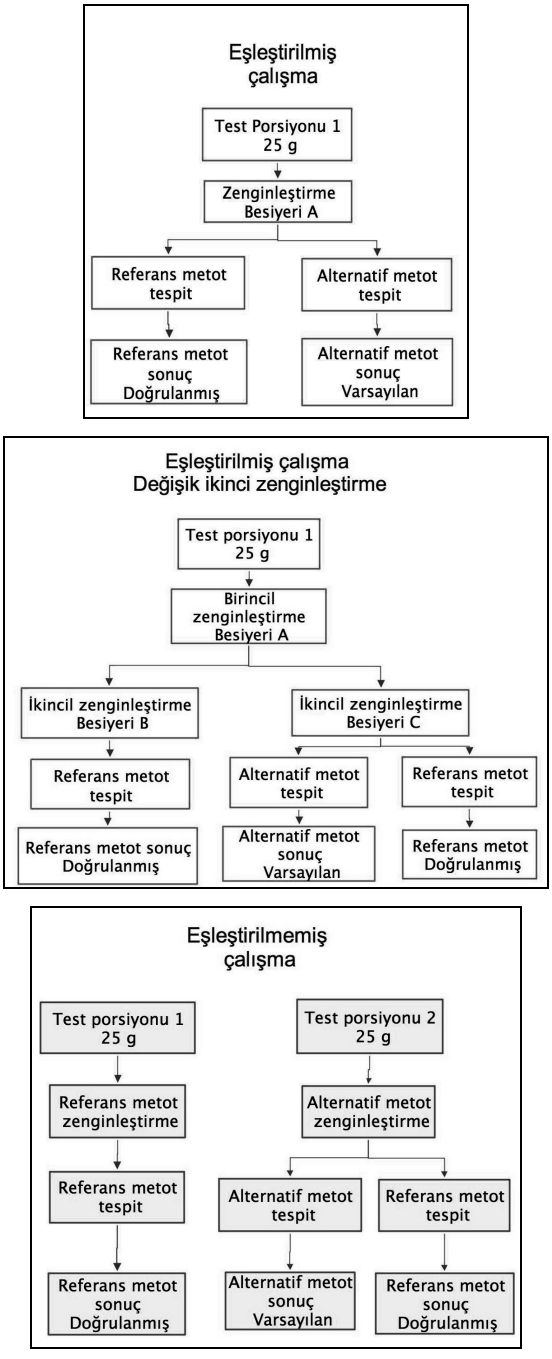


Şekil 13.02. Kalitatif metotlarda geçerli kılma parametreleri

Eşleştirilmiş ve Eşleştirilmemiş Çalışma

Kalitatif metotlarda metodun ön zenginleştirme basamağının ortak olup olmamasına göre uygulamada değişiklik yapılması gerekir. Referans ve alternatif metotlar mümkün olduğunca aynı numunede hatta aynı test porsiyonunda çalışılmalıdır. Bu durum ancak aynı ön aşamaya sahip referans ve alternatif metotların karşılaştırılması yapılırken mümkün olacaktır. Aksi durumda değişik test porsiyonlarının kullanımı sağlanmalıdır.

Aynı test porsiyonunun kullanılması ve bu porsiyondan hem referans hem de alternatif metot ile çalışma yapılması durumuna *eşleştirilmiş çalışma* denilmektedir. İlk aşamanın aynı olmadığı çalışmalar, *eşleştirilmemiş çalışma* olarak tanımlanmakta, ayrı test porsiyonları ayrı olarak zenginleştirilmekte ve analiz edilmektedir. Bu durumda çalışılan test porsiyonu zenginleştirme sonrasında hem alternatif hem de doğrulama amacıyla referans metot ile çalışılmalıdır (Şekil 13.03) [4].



Şekil 13.03. Eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş çalışma deseni [4]

Hassasiyet Çalışması

Hassasiyet (sensitivity), metodun hedef organizmaları tespit etme kabiliyetidir [1]. Bu çalışmanın amacı referans ve alternatif metot arasındaki hassasiyet farkının belirlenmesidir. Kabul limitleri, çalışmanın eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş olmasına göre değişiklik gösterir.

Değişik kategoriler ve bunları temsil eden tipte gıdalar ile çalışılma yapılmalıdır. Seçilecek kategoriler, geçerli kılma kapsamındaki mikroorganizma tipi veya mikroorganizma gruplarına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Eğer metot geniş kapsamlı olarak tüm gıdalara uygulanacaksa en az beş kategoride gıda ile çalışma yapılmalıdır. Sınırlı sayıda kategoriler için oluşturulmuş metotların sadece ilgili kategorilerde çalışılması yeterlidir. Metot, gıda dışında ayrıca yem ve/veya gıda üretim alanlarının çevre numuneleri ve/veya birincil üretim aşamaları için de kullanılacaksa her biri ayrı birer kategori olarak eklenmelidir. Her kategoriden en az üç değişik temsili numune çalışılmalıdır. Temsili numuneler 13.05. Bölümde verilmiştir. Ancak çalışmalar için bu numuneler zorunlu olarak değerlendirilmemelidir. Yüksek ve düşük sayıda doğal florası bulunan, farklı stres koşullarına maruz kalmış mikroorganizmalar ve işlenmemiş gıdalar gibi değişik tipte numuneler ile çalışma sağlanmalıdır. Kategoriler arasında kombinasyon yapılması durumunda bunun risk analizine göre yapılması gerekmektedir [2].

Çalışmada doğal veya yapay kontamine numune kullanılabilir. Numune seçiminde öncelik, doğal kontamine numune ile çalışılmasıdır. Eğer yeterli sayıda doğal kontamine numune bulunamıyorsa yapay kontamine numune de kullanılabilir, ancak bu numunelerin nasıl hazırlandığı detaylı olarak belirtilmelidir [2].

İncelenen her kategoride 60 bağımsız numune çalışılmalıdır. Bu durumda her kategoride üç farklı numune tipinde her biri için 20 bağımsız temsili numunede analiz yapılmalıdır. Numunelerin ne tamamı negatif ne de tamamı pozitif olmalıdır. Tercihen %50 pozitif, %50 negatif oranı olabilir. Her bir kategoride en az 30 numune referans ve/veya alternatif metot ile pozitif sonuç vermelidir [2].

Birçok alternatif metot protokolü iki aşamadan oluşur. Birincisi zenginleştirme, diğeri de tespit basamağıdır. Alternatif metodun sonucu, ikinci basamağın sonunda elde edilir. Metot protokolünde doğrulama basamağı bulunmuyorsa sonuçlar zenginleştirme ve tespit basamağından sonra elde edilen ile aynı olur. Eğer referans ve alternatif metodun zenginleştirme basamakları (örneğin birincil/seçici olmayan ve ikincil/seçici olan) ve bunların inkübasyon süreleri farklı ise geçerli kılma çalışması sırasında ilave bir doğrulama basamağı eklenmelidir (Şekil 13.03).

Hassasiyet çalışmasında alternatif metodun sonuçları doğrulanmalıdır. Eşleştirilmemiş çalışmada alternatif metot ile elde edilen bütün sonuçlar ve eşleştirilmiş çalışmada referans metodun negatif, alternatif metodun pozitif

verdiği bütün sonuçlar doğrulanmalıdır. Bu çalışmalar referans metodun doğrulama prosedürlerine dayanmalıdır [2].

Hassasiyet çalışması sonuçlarının raporlanmasında, örneğin tipi, doğal ya da yapay kontamine edilip edilmediği, çalışma dizaynının nasıl olduğu (eşleştirilmiş, eşleştirilmemiş) ve alternatif metotların doğrulama testleri hakkında bilgi verilmelidir. ISO 16140-2 içinde sonuçların değerlendirilmesi aşağıdaki şekilde anlaşılabilirliğini artırmak için ufak modifikasyonlar yapılarak Çizelge 13.01, 13.02 ve 13.03'de verilmiştir [2].

Çizelge 13.01. Referans ve alternatif metotların eşleştirilmiş çalışma sonuçlarının karşılaştırılması ve yorumlanması

Numunelerin referans ve alternatif metotlar için sonuçları			
Referans metot sonucu	Alternatif metot sonucu (alternatif metot prosedüründe belirtilen doğrulama aşamasını içeren)	Doğrulanmış alternatif metot sonucu (alternatif metotların yukarıda metin içinde anlatıldığı gibi doğrulanması)	Yorum (alternatif metodun sonucunun doğrulanmasına dayalı olarak)
+	+	Gerekli değil (Ek bir doğrulama testine gerek yoktur. Doğrulanmış alternatif metot sonucu ile alternatif metot sonucu aynıdır)	Pozitif Anlaşma (PA)
–	–	Gerekli değil (Ek bir doğrulama testine gerek yoktur. Doğrulanmış alternatif metot sonucu ile alternatif metot sonucu aynıdır)	Negatif Anlaşma (NA)
+	–	Gerekli değil (alternatif metodun sonucu negatif olduğundan ek bir doğrulama yapılamaz)	Yanlış negatif alternatif metot sonucuna bağlı olarak Negatif Sapma (ND)
–	+	+	Pozitif Sapma (PD) ./..

Numunelerin referans ve alternatif metotlar için sonuçları			
Referans metot sonucu	Alternatif metot sonucu (alternatif metot prosedüründe belirtilen doğrulama aşamasını içeren)	Doğrulanmış alternatif metot sonucu (alternatif metotların yukarıda metin içinde anlatıldığı gibi doğrulanması)	Yorum (alternatif metodun sonucunun doğrulanmasına dayalı olarak)
–	+	–	Yanlış pozitif alternatif metot sonucuna bağlı olarak Negatif Anlaşma (NA). Bu yanlış pozitif (FP) sonuç, yanlış pozitif oranının hesaplanması için kullanılmalıdır]

Çizelge 13.02. Referans ve alternatif metotların eşleştirilmemiş çalışma sonuçlarının karşılaştırılması ve yorumlanması

Numunelerin referans ve alternatif metotlar için sonuçları			
Referans metot sonucu	Alternatif metot sonucu (alternatif metot prosedüründe belirtilen doğrulama aşamasını içeren)	Doğrulanmış alternatif metot sonucu (alternatif metotların yukarıda metin içinde anlatıldığı gibi doğrulanması)	Yorum (alternatif metodun sonucunun doğrulanmasına dayalı olarak)
+	+	+	Pozitif Anlaşma (PA)
+	+	–	Yanlış pozitif alternatif metot sonucuna bağlı olarak Negatif Sapma (ND). [Bu yanlış pozitif (FP) sonuç, yanlış pozitif oranının hesaplanması için kullanılmalıdır]
–	–	–	Negatif Anlaşma (NA)
–	–	+	Yanlış negatif alternatif metot sonucuna bağlı olarak Negatif Anlaşma (NA)
+	–	–	Negatif Sapma (ND) ./..

Numunelerin referans ve alternatif metotlar için sonuçları			
Referans metot sonucu	Alternatif metot sonucu (alternatif metot prosedüründe belirtilen doğrulama aşamasını içeren)	Doğrulanmış alternatif metot sonucu (alternatif metotların yukarıda metin içinde anlatıldığı gibi doğrulanması)	Yorum (alternatif metodun sonucunun doğrulanmasına dayalı olarak)
+	–	+	Yanlış negatif alternatif metot sonucuna bağlı olarak, Negatif Sapma (ND)
–	+	+	Pozitif sapma (PD)
–	+	–	Yanlış pozitif alternatif metot sonucuna bağlı olarak Negatif Anlaşma (NA). [Bu yanlış pozitif (FP) sonuç yanlış pozitif oranının hesaplanması için kullanılmalıdır]

Çizelge 13.03. Referans ve alternatif metotların tüm kategoriler ve numunelerden elde edilen sonuçlarının özeti

	Referans metot pozitif (R+)	Referans metot negatif (R–)
Alternatif metot pozitif (A+)	+/+ Pozitif Anlaşma (PA)	–/+ Pozitif Sapma (PD)
Alternatif metot negatif (A–)	+/– Negatif Sapma (ND)	–/– Negatif Anlaşma (NA)

Alternatif metodun ve referans metodun hassasiyeti, bağıl doğruluk ve yanlış pozitif oranı aşağıda 1, 2, 3 ve 4 No.lu eşitlikler kullanılarak hesaplanabilir [2].

Alternatif metodun hassasiyeti; $$SE_{alt} = \frac{(PA + PD)}{(PA + ND + PD} \times 100\% \quad (1)$$

Referans metodun hassasiyeti; $$SE_{ref} = \frac{(PA + ND)}{(PA + ND + PD)} \times 100\% \quad (2)$$

Bağıl doğruluk; $$RT = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\% \quad (3)$$

N: toplam numune sayısı

Alternatif metodun yanlış pozitif oranı; $FPR = \frac{FP}{NA}$ x 100% (4)

Eşleştirilmiş çalışmalar için negatif sapma ile pozitif sapma arasındaki fark ve bunların toplamı (*ND – PD*, *ND + PD*) ile eşleştirilmemiş çalışmalar için negatif sapma ile pozitif sapma arasındaki fark (*ND – PD)* hesaplanır. Elde edilen değerler Çizelge 13.04'de verilen kabul limitleri ile karşılaştırılır. Bu kabul limitleri uzman görüşlerinden elde edilen uzlaşı verileridir. Sonuçların yorumlanması ayrı ayrı ve tüm kategorilerin toplamı için yapılmalıdır. Eğer elde edilen değer, kabul limitlerinin üzerinde ise şartları sağlamıyor demektir. Kriterlere uyulmadığı durumlarda sebep analizi ile durum incelenmelidir. Amaca uygunsuzluğun belirli kategori mi yoksa tüm kategorileri mi kapsadığına karar verilmelidir. Eğer alternatif metot limitleri sağlamamasına rağmen kabul ediliyorsa gerekçesi raporda belirtilmelidir [2].

Çizelge 13.04. Kullanılan kategori sayısı ile ilişkili olarak eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş deney deseni için kabul limitleri

Kategori sayısı	Eşleştirilmiş çalışma		Eşleştirilmemiş çalışma
	(*ND – PD*)	(*ND + PD*)	(*ND – PD*)
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7

Bağıl Tespit Seviyesi Çalışması

Tespit seviyesi (level of detection - LOD), ölçüm prosedürü ile x saptama olasılığında ölçülebilen, analit derişimidir. Örneğin LOD_{50} test sonuçlarının %50'sinin pozitif sonuç verdiği seviyedir [5].

Bağıl tespit seviyesi alternatif metoda karşı referans metodun tespit seviyesi ile belirlenir. Değerlendirme bağıl tespit seviyesinin (RLOD) hesaplanması temeline dayanır ve üç seviyede yapay kontamine numuneler ile yapılan tekrarlar kullanılır [2].

Çalışmada hassasiyet için seçilen kategoriler kullanılabilir. Her bir kategoride bir temsili ürün seçilebilir. Daha etkili olması için mümkünse seçilen temsili ürün hassasiyet çalışmasında kullanılan üründen farklı olmalıdır. Her bir tipe farklı suş inoküle edilmelidir [2].

Her bir temsili ürün için en az üç seviyede çalışma yapılmalıdır. Bunlar negatif kontrol seviyesi, düşük seviye ve yüksek seviyedir. İdeal olanı düşük seviyenin

tespit seviyesi olması (örneğin test porsiyonunda 0,7 kob) ve yüksek seviyenin teorik tespit seviyesinin biraz üzerinde (örneğin test porsiyonunda 1-1,5 kob) olmasıdır. Düşük seviye, referans metot ile en azından kademeli geri kazanımı sağlamalıdır. Kademeli geri kazanım, test edilen numunelerde düşük seviyede %25 ile %75 arasında olmalıdır. Kontaminasyon seviyesi negatif kontrol hariç hesaplanmalıdır [2].

Negatif kontrol seviyesinde en az 5 tekrar numune her iki metot ile çalışılmalıdır. İkinci düşük seviyede en az 20, üçüncü yüksek seviyede en az 5 tekrar her iki metot ile çalışılmalıdır. Negatif kontrol seviyesi pozitif sonuç üretmemelidir. Eğer pozitif sonuç elde ediliyorsa çalışma tüm seviyelerde tekrarlanmalıdır [2].

Alternatif metot ile elde edilen sonuçlardaki pozitif sapma ek olarak doğrulanmalıdır. RLOD, doğrulama sonrasında değerlendirilmelidir [2].

Her bir kategoride RLOD tamamlayıcı log log modeline uygun olarak hesaplanır. İstatistiksel model için formüller aşağıda belirtilmiş olmakla birlikte http://standards.iso.org/iso/16140 veya http://www.wiwiss.fu-berlin.de/ fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich sitesindeki Prof. Dr. Peter-Th. Wilrich'in programı kullanılarak da hesaplama yapılabilir [2, 6].

Matriks etkisi F_i çözümü		$$\sum_{j=1}^{q}\left(\frac{y_j d_j}{\exp\left(A_o \hat{F} d_j\right)-1}-\left(n_j-y_j\right)d_j\right)=0$$	(5)
Log matriks etkisinin standart sapması S_{fi}		$$S_f=\frac{1}{\sqrt{\sum_{f=1}^{q}\frac{n_j\left(A_0\hat{F}d_j\right)^2}{\exp\left(A_0\hat{F}d_j\right)-1}}}$$	(6)
LOD	Tespit limiti d_i	$$\hat{d}_p=-\frac{\ln(1-p)}{A_0\hat{F}}$$	(7)
	Alt güven limiti $d_{i,L}$	$$d_{p,L}=\frac{\hat{d}_p}{\exp\left(2S_f\right)}$$	(8)
	Üst güven limiti $d_{i,U}$	$$d_{p,U}=\hat{d}_p\cdot\exp\left(2S_f\right)$$	(9)
Matriks etkisi $\lvert Z_i\rvert$		$$\lvert z\rvert=\lvert ln\hat{F}\rvert\sqrt{\sum_{j=1}^{q}\frac{n_j\left(A_0 d_j\right)^2}{\exp\left(A_0 d_j\right)-1}}$$	(10)

Matriks *i*'de ölçülen, q_i değişik seviyelerde *j*, kontaminasyon d_{ij} (kob/g veya kob/ml).

j = 1, …. q_i, inokülasyon serisi,
i = 1, …. k matriks sayısı,
n_{ij} = *j* serisinde yapılan ölçüm sayısı $n_{ij,}$
d_{ij} = inokülum seviyesi (kob/g, kob/ml)
y_{ij} = pozitif sonuçlar

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}} \quad (11)$$

Bağıl LOD, alternatif metodun referans metoda oranıdır.

Eşleştirilmiş çalışmalarda kabul limiti 1,5 olarak, eşleştirilmemiş çalışmalarda 2,5 olarak kabul edilir. Alternatif metodun LOD'si referans metodun LOD'sinden eşleştirilmiş çalışmalarda 1,5 kat, eşleştirilmemiş çalışmalarda 2,5 kattan fazla olmamalıdır. Alternatif metodun LOD'sinin düşük olduğu durumlar, alternatif metodun referans metottan daha düşük seviyeleri tespit etmesi anlamına gelir ve bu durum her zaman uygundur. Elde edilen değerlerin limitleri geçmesi metot şartlarının karşılanmadığı anlamındadır. Bu durumda kök neden analizi ile sebep değerlendirmesi yapılmalıdır [2].

RLOD hesaplanmasında tamamlayıcı log log model yanında Spearman-Kaerber metodu da kullanılabilmektedir. RLOD hesaplanmasına ek olarak, AOAC tespit olasılığı (POD) modeline göre de veriler değerlendirilebilir. Bu model metotların eşdeğerliği ile ilgili ek veri verebilir.

ISO 16140-2'de LOD_{50} kullanılır ve kontaminasyon seviyesinin %50'sinin pozitif olmasının beklendiği test sonuçlarıdır. Mikrobiyolojik analizlerde LOD_{50} yanında bazen LOD_{90}'da hesaplanabilmektedir. PCR ile yapılan çalışmalarda ise LOD_{95} hesaplanmaktadır.

Dâhililik ve Haricilik Çalışması

Dâhililik alternatif metodun hedef mikroorganizmayı tespit edebilmesi, haricilik ise hedef olmayan mikroorganizmaların tespit etmemesidir [1].

Dâhililik çalışması, alternatif metot ile tespit edilebilecek veya sayılacak saf hedef mikroorganizmalar kullanılarak; haricilik çalışması, potansiyel çapraz reaksiyona sebep olabilecek ancak alternatif metot ile tespiti veya sayımı beklenmeyen/ hedef olmayan mikroorganizmalar kullanılarak yürütülen çalışmadır [2].

Dâhililik ve haricilik çalışmalarında hedef grup alternatif metodun ölçüm prensibi göz önünde bulundurularak aşağıdaki şekilde gruplanmaktadır [2]:

-Tanımlama basamağı bulunmayan grup (örneğin toplam canlı, koliform, maya ve laktik asit bakterileri): Dâhililik çalışması için referans metotta gelişebilen suşlar kullanılır. Haricilik çalışmasında elde edilen sonucun negatif olması beklendiğinden hedef gruba göre karar verilir.

-Aile (örneğin *Enterobacteriaceae):* Dâhililik çalışmasında ailede bulunan tüm cinsleri temsil edecek şekilde mümkün olduğu kadar geniş bir aralıkta suş kullanılır. Haricilik çalışmasında hedef olmayan grup yakın ilişkili başka bir ailedir.

-Cins (örneğin *Salmonella, Pseudomonas* ve *Listeria):* Dahililikte cinste bulunan türleri temsil edecek şekilde mümkün olduğu kadar geniş bir aralıkta suş kullanılır. Haricilikte hedef olmayan grup biyokimyasal veya genetik olarak yakın olan başka bir cins olmalıdır.

-Tür (örneğin *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*)*:* Dâhililikte türde bulunan suşlar alt tipleri göz önüne alınarak seçilmelidir. Haricilikte hedef olmayan grup aynı cinste bulunan başka bir türdür.

-Serotip, faj tip (örneğin *Salmonella enterica* serovar Enteritidis): Dâhililikte sero ve faj tipleri için değişik kaynaklardan temin edilen serotipler ve faj tipleri kullanılır. Haricilikte hedef olmayan grup aynı türe ait başka bir serotip veya faj tiptir.

Her bir suş biyokimyasal ve/veya serolojik ve/veya genetik olarak karakterize edilmelidir. Geçerli kılma kapsamı göz önüne alınarak gıda, yem ve üretim alanlarından izole edilen suşlar tercihen kullanılmalıdır. Bununla birlikte klinik, çevre ve kültür koleksiyonları suşları da kullanılabilir [2].

Dâhililik çalışması için en az 50 saf kültür (hedef) mikroorganizma kullanılmalıdır. *Salmonella* metotları için en az 100 kültür değişik *Salmonella* serotipleri kullanılmalıdır. Haricilik testi için en az 30 saf kültür (hedef olmayan) mikroorganizma test edilmelidir [2].

Bazı mikroorganizmalarda dâhililik ve haricilik çalışması için yeterli sayıda test mikroorganizmasının bulunması ya da kültüre edilmesi mümkün olmayabilir. Bu durumda geçerli kılma çalışmasına katılan tüm taraflarca yapılan anlaşma ile bu suşların seçimi yapılmalıdır [2].

Suşların korunması ve devamlılığı ile ilgili gerekli tüm bilgiler ISO 11133 içerisinde bulunmaktadır [7].

Test suşlarının inokülasyonunda her bir test bir kere ve sadece alternatif metot ile metodun doğrulama basamağını da içerecek şekilde çalışılır. Her bir test suşunun saf kültürü kullanılarak uygun besiyerine inokülasyon yapılır ve çalışmalarda numune kullanılmaz [2].

Dahililik çalışmasında saf kültürler seçici olmayan besiyerinde optimum gelişme koşullarında yüksek sayıda bakteri elde edilecek şekilde çoğaltılır. İnokülum alternatif metodun minimum tespit seviyesinin 10 - 100 katı olacak seviyede yapılır. Eğer alternatif metodun farklı numune tipleri için farklı zenginleştirme yöntemleri bulunuyorsa en zorlayıcı olanı kullanılır. Şüpheli ve negatif sonuç alınırsa test ve kültür referans metot ile kontrol edilir. Eğer alternatif metot doğrulama basamağı içeriyorsa doğrulama testleri seçilen suşun doğrulamasını da içermelidir [2].

Haricilik çalışmasında saf kültürler seçici olmayan besiyerinde optimum gelişme koşullarında yüksek sayı elde edilecek şekilde çoğaltılır. Eğer metot tespit öncesinde seçici besiyeri basamağı içeriyorsa haricilik çalışması için bu besiyeri seçici olmayan bir besiyeri ile değiştirilir. Alternatif metot pozitif veya şüpheli sonuç veriyorsa sonuçlar seçici zenginleştirmeyi de kapsayacak şekilde uygulanır. Alternatif metodun farklı numune tipleri için farklı zenginleştirme yöntemleri bulunuyorsa her biri suş paneli ile çalışılır. Referans metot ile tespit edilemeyen suşlar için ek referans metot kullanılır [2].

13.02.01.02. Kantitatif Metotlar

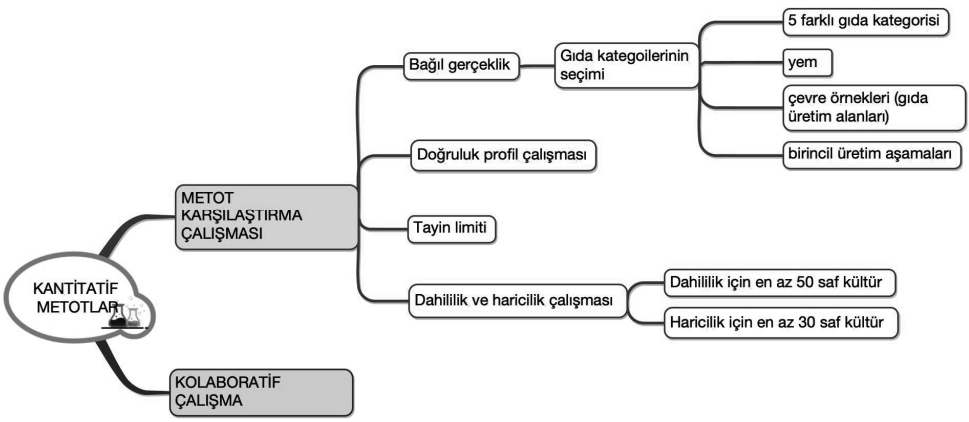
Kantitatif metotlarda metot karşılaştırma çalışması dört basamaktan oluşur:

-Bağıl gerçeklik çalışması - Çeşitli kontamine numunelerde alternatif metot ile referans metot sonuçlarının karşılaştırılması,

-Doğruluk profili (AP) çalışması - Tek bir kategoride yapay kontamine numunelerin tekrarlar halinde alternatif ve referans metot ile çalışılması,

-Tayin limiti çalışması (LOQ) - Her bir kategoride tek bir yapay kontamine edilmiş numunelerin alternatif metot ile çalışılması,

-Dâhililik, haricilik çalışması.



Şekil 13.04. Kantitatif metotlarda geçerli kılma parametreleri

Bağıl gerçeklik çalışması

Bağıl gerçeklik, aynı numuneler üzerine referans metodun yanıtı ve alternatif metodun yanıtı arasındaki ilişki derecesini gösterir [5]. Doğal ya da yapay kontamine numuneler kullanılabilir. Değişik kategorilerde ve tiplerde numuneler test edilir.

Geçerli kılma çalışmasında kullanılacak kategori ve tiplerin seçimi kapsama göre belirlenir. Eğer metot geniş aralıkta gıdalar için kullanılacaksa en az beş gıda kategorisi ile uygulama yapılır. Metodun kullanımı sınırlı kategori içeriyorsa, örneğin "hazır yemek, hazır ısıtılıp yenilen" veya "ısıl işlemden geçmiş süt ve süt ürünleri" gibi ise, sadece bu kategorilerde çalışma yapılması yeterlidir. Metot kapsamı gıda kategorisine ek olarak yem numuneleri, çevresel numuneler ve birincil üretim basamaklarını içeriyorsa bunlar ek kategoriler olarak çalışmaya dâhil edilmelidir [2].

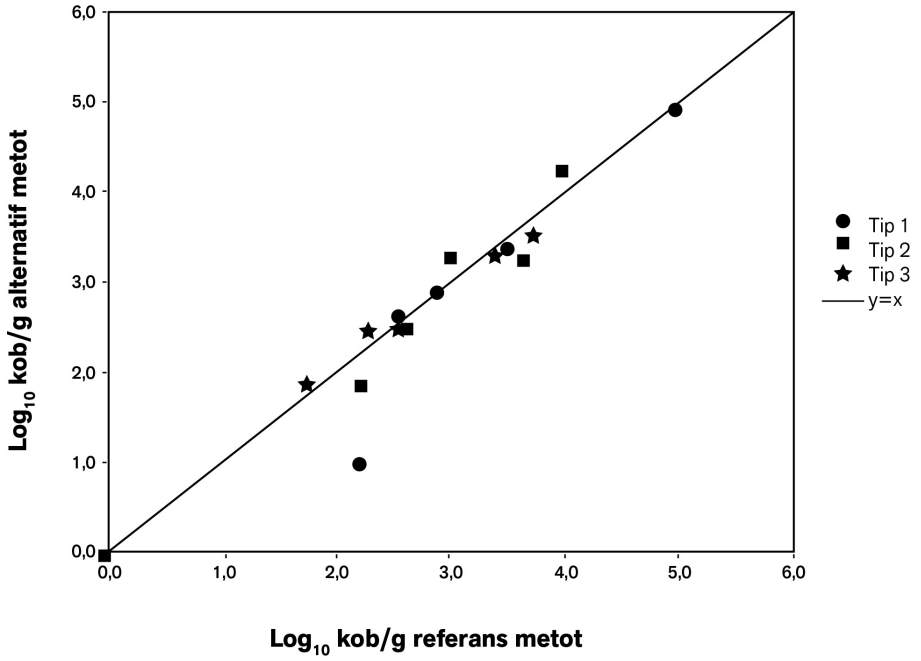
Her bir kategoride (gıda ve diğerleri) en az üç değişik tip gıda çalışmaya eklenmelidir. Numunelerin doğal kontamine olması yüksek önceliktedir, ancak yeterli sayıda kontamine numune bulunmuyorsa yapay kontamine kullanılabilir [2].

Düşük ve yüksek doğal floraya sahip gıda tiplerinin üretim prosesine bağlı olarak değişik strese maruz kalmış ve çiğ numunelerin kullanımı sağlanmalıdır [2].

Örnek olarak *Listeria monocytogenes* sayımı için metot geçerli kılma çalışmasında, "tüketime/ tekrar ısıtmaya hazır et ürünleri" kategorisinde seçilebilecek 3 gıda tipi; pişmiş et ürünü (düşük sayıda floraya sahip, ısı stresine maruz kalmış), fermente ya da kurutulmuş et ürünü (yüksek floraya sahip, pH stresi bulunan) ve çiğ dumanlanmış ürün (a_w < 0,92) (orta seviyede floraya sahip, su aktivitesi stresi oluşturulmuş) kullanılabilir [2].

Her bir kategoride en az 3 tip numune bulunmalı ve toplamda minimum 15 numune test edilmelidir. Yani her tipten en az 5 temsili numune test edilmelidir. Numunelerin kontaminasyon seviyeleri de doğal kontaminasyon çeşitliliğinde olmalıdır [2].

Analiz sonuçları Bland-Altman metodu kullanılarak analiz edilmelidir. Her bir kategorideki her bir numune ve tüm kategorilerdeki her bir numune için grafik çizilir. Bu grafik ile görsel olarak hızlı bir şekilde iki metodun uyumu izlenebilir (şekil 13.05, şekil 13.06) [2].



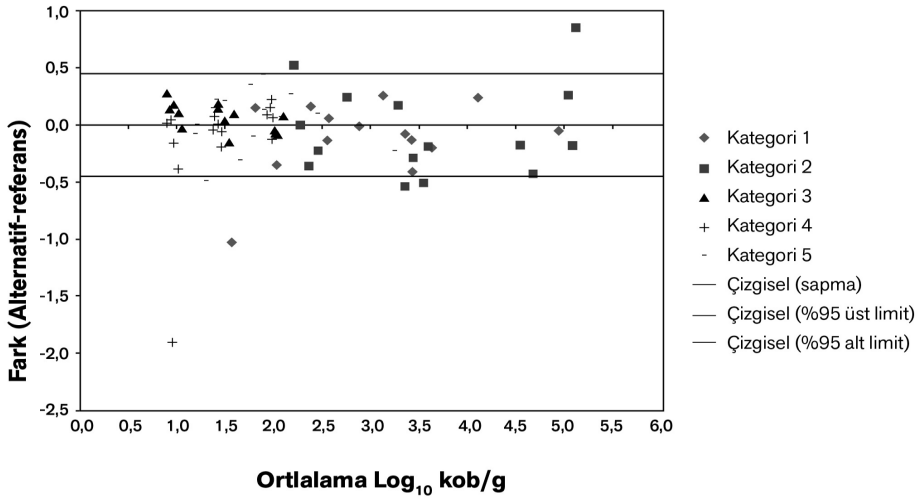
Şekil 13.05. Bir kategori için alternatif metoda karşı referans metodun serpme grafiği [2].

Eğer referans veya alternatif metot için herhangi bir sonuç, tayin limitinin altında ise veri yerine 1 Log_{10} değeri yerleştirilir. Aynı şekilde eğer bir veri, üst limitin üzerinde ise üst limite 1 Log_{10} değeri eklenir. Referans ve alternatif metoda ait her bir çift verinin ortalaması ve farkları alınır, farkları üzerinden grafik çizilir. Metotlar için farkın sıfır olduğu özdeşlik çizgisi ve üst - alt %95 güven limiti çizilir [2].

Referans ve alternatif metoda ait her bir kategori, tüm kategorilerin ortalama farkı, farkların standart sapması ve kabul edilen limitler aşağıdaki formül (Formül 12) kullanılarak hesaplanır ve Çizelge 13.05'te belirtilen şablon kullanılarak tüm kategorilerin sonuçları özetlenir. Formüldeki n, çift veri sayısını; T, belirlenen olasılıkta t testi değerini ifade etmektedir [2].

$$\left[\bar{D} \pm T \cdot S_D \sqrt{1+\frac{1}{n}}\right] \quad (12)$$

$$T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right);(n-1)} \quad (13)$$



Şekil 13.06. Tüm kategoriler için Bland-Altman fark grafiği [2].

Çizelge 13.05. Tüm kategoriler için sonuçların özet olarak kaydedilmesi

Kategori	Tip	Numune	Log_{10} kob		Ortalama	Fark
			Referans Metot sonucu	Alternatif Metot Sonucu		
1	1	1	R1	A1	(R1 + A1)/2	D1=A1 - R1
		2	R2	A2	(R2 + A2)/2	D2=A2 – R2
		3	R3	A3	(R3 + A3)/2	D2=A3 – R3
		4	R4	A4	(R4 + A4)/2	D2=A4 – R4
		5	R5	A5	(R5 + A5)/2	D5=A5 – R5
1	2	6	R6	A6	(R6 + A6)/2	D2=A6 – R6
		7	R7	A7	(R7 + A7)/2	D2=A7 – R7
		8	R8	A8	(R8 + A8)/2	D2=A8 – R8
		9	R9	A9	(R9 + A9)/2	D2=A9 – R9
		10	R10	A10	(R10 + A10)/2	D2=A10 – R10
1	3	–	–	–	–	–
Kategori 1'in Ortalaması				$\overline{D}_1$		
Kategori 1'in Standart Sapması				S_{D1}		
x4			Rx	Ax	(Rx + Ax)/2	Dx=Ax-Rx
Ortalama Kategori X				$\overline{D}_x$		
Kategori x Standart Sapması				S_{Dx}		
Tüm Kategorilerin Ortalaması				$\overline{D}_{all}$		
Tüm Kategorilerin Standart Sapması				S_{Dall}		

Grafik ortalama değere karşı her bir kategorideki numunelerin farkı, özdeşlik çizgisi (sıfır fark), %95 güven aralığı üst ve alt limitler kullanılarak oluşturulur. Grafik görsel olarak değerlendirilir, 20 veride bir verinin güven limitinin dışına

çıkması beklenen bir durumdur. Beklenen ile uyumlu olmayan herhangi bir durum mutlaka kayıt altına alınmalıdır [2].

Doğruluk Profili Çalışması

Doğruluk profili çalışması, kantitatif metotlarda değişik referans seviyelerinde kabul edilen aralık ile β–beklenen tolerans aralığının birleştirilmesi ile elde edilen ölçüm kapasitesinin grafiksel olarak gösterimidir [5]. Her bir kategoride en az bir tip gıdada 6 yapay kontamine numune ile çalışma yapılmalıdır. Her bir numuneden 5 değişik test porsiyonunu (tp) temsilen 5 paralel çalışma yapılmalıdır. Seçilen gıda tipindeki 6 numune, iki düşük, iki orta, iki yüksek olacak şekilde farklı seviyelerde kontamine edilmelidir. Örneğin kurutulmuş süt ürünleri, tam yağlı süt tozu, bebek formülü kullanılabilir [2].

Sonuçların ISO 16140-2'de aşağıdaki Çizelge 13.06 üzerinde Log_{10} tabanında kaydedilmesi önerilmektedir.

Çizelge 13.06. Doğruluk çalışması sonuçları (Log_{10} kob/g)

Kategori	Tip	Seviye	Referans metot					Alternatif metot				
			tp1 x_1	tp2 x_2	tp3 x_3	tp4 x_4	tp5 x_5	tp1 y_1	tp2 y_2	tp3 y_3	tp4 y_4	tp5 y_5
Kategori 1	Tip 1	Numune 1 (düşük)										
		Numune 2 (düşük)										
		Numune 3 (orta)										
		Numune 4 (orta)										
		Numune 5 (yüksek)										
		Numune 6 (yüksek)										
…..	…..	…..										
Kategori x	Tip x	Numune 1-6										

Sonuçlar değerlendirilirken aşağıdaki matematiksel işaretler kullanılır:

i, numuneleri; *q,* numune sayısını temsil eder ($1 \leq i \leq q$).

j, test porsiyonlarını; *n,* test porsiyonu sayılarını temsil eder ($1 \leq j \leq n$).

x_{ij}, referans metot ile çalışılmış $1 \leq i \leq q$ kadar numunelerin $1 \leq j \leq n$ kadar olan tekrarlarında *i*'inci numunenin *j* tekrarının Log_{10}'a çevrilmiş sonucudur.

y_{ij}, alternatif metot ile çalışılmış $1 \leq i \leq q$ kadar numunelerin $1 \leq j \leq n$ kadar olan tekrarlarında *i*'inci numunenin *j* tekrarının Log_{10}'a çevrilmiş sonucudur.

Her bir numune, her iki metot ile tekrarlanabilirlik koşullarında ölçülür. y_i değerlerinin normal dağıldığı varsayılır. β-beklenen tolerans aralığı (β-ETI) değeri hesaplanır. Kabul kriteri AL= ±0,5 Log_{10} olup referans ve alternatif metot arasındaki farkı ifade eder [2].

Adım 1: Her bir i örneği için merkez x_i değeri referans metot ile elde edilmiş ve Log10'a çevrilmiş değerlerin medyanı alınır.

x_i = medyan(x_{ij})

Adım 2: Her bir i örneği için merkez y_i değeri alternatif metot ile elde edilmiş ve Log_{10}'a çevrilmiş değerlerin medyanı alınır.

y_i = medyan(y_{ij})

Adım 3: Her bir *i* örneği için standart sapma S_{alt} aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$S_{alt,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{j=1}^{n}\left(y_{ij} - \overline{y_i}\right)^2} \tag{14}$$

Adım 4: Birleşik standart sapma aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$S_{alt} = \sqrt{\frac{1}{q}\sum_{i=1}^{q} S_{alt,i}^2} \tag{15}$$

Adım 5: Adım 3 ve 4'deki gibi referans metodun da standart sapması ve birleşik standart sapması hesaplanır.

$$S_{ref,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{j=1}^{n}\left(x_{ij} - \overline{x_i}\right)^2} \tag{16}$$

$$S_{ref} = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n} S_{ref,i}^2} \tag{17}$$

Adım 6: Her bir *i* örneği için sapma, her iki metot ile belirlenen medyanların farkı alınarak hesaplanır.

$$B_i = Y_i - X_i \tag{18}$$

Adım 7: Her bir *i* örneği için β-ETI hesaplanır.

$$B_i \pm T \cdot S_{alt}\sqrt{1+\frac{1}{n}} \tag{19}$$

T değeri belirlenen olasılık ve serbestlik derecesindeki (*q*.(n-1)=6.(5-1)=24) t-testi değerini ifade eder. ISO 16140 standardının bu kısmı için β değeri %80 olarak ayarlanır. T değeri, valide edilen örneğin β-ETI'nin kapsam faktörüdür. Buna bağlı olarak üst limit (U_i) ve alt limit (L_i) aşağıdaki formüller üzerinden hesaplanır.

$$U_i = B_i + T \cdot S_{alt}\sqrt{1+\frac{1}{n}} \tag{20}$$

$$L_i = B_i - T \cdot S_{alt}\sqrt{1+\frac{1}{n}} \tag{21}$$

$$T\ tablosunda = T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right)q(n-1)} \tag{22}$$

T tablosu değeri, Excel üzerinden= TINV [(1-β); q (n-1)] formülüyle hesaplanabilir.

Adım 8: Her bir kategori için aşağıdaki şekilde bir tablo doldurulur.

Çizelge 13.07. Karşılaştırma çalışmasının istatistiksel sonuçlarının sunumu

Kategori	Numune	Ref merkez değer	Alt merkez değer	Sapma	Üst β-ETI	Alt β-ETI	Üst AL	Alt AL
Kategori 1	Numune 1	X_i	Y_i	B_i	U_i	L_i	+AL	-AL
	Numune 2							
	Numune 3							
	Numune 4							
	Numune 5							
	Numune 6							

Elde edilen verilerden aşağıdaki şekilde bir grafik oluşturulur. Grafiğin horizontal eksenine X_i Log_{10} değerleri, vertikal eksenine sapma, kabul limiti (+/- 0,5), alt ve üst tolerans limitleri Log_{10} değerleri girilir.

Grafiğin horizontal alanı referans metot ile elde edilen verileri içerir. Referans değer ile kontaminasyonun ortalama değeri arasındaki farklar siyah noktalar halinde belirtilir. Sapmanın olmadığı durumlarda bu değerler horizontal referans çizgisinde yer alır. Kabul limitleri iki sıra halinde kesik çizgi ve β-ETI çizgileri kırıklı düz çizgi halinde verilir.

Eğer i'inci doğruluk profilinde $U_i \leq AL$ ve $L_i \geq -AL$ ise alternatif metot ve ilgili kategori veya toplam kategorilerde referans metot ile eşdeğerdir.

Eğer üst ve alt limitler aşılıyorsa ve standart sapma $S_{ref} > 0{,}125$ ise aşağıdaki çalışma uygulanır.

Adım 9: Standart sapma üzerinden yeni kabul limitleri oluşturulur: $AL_s = 4S_{ref}$

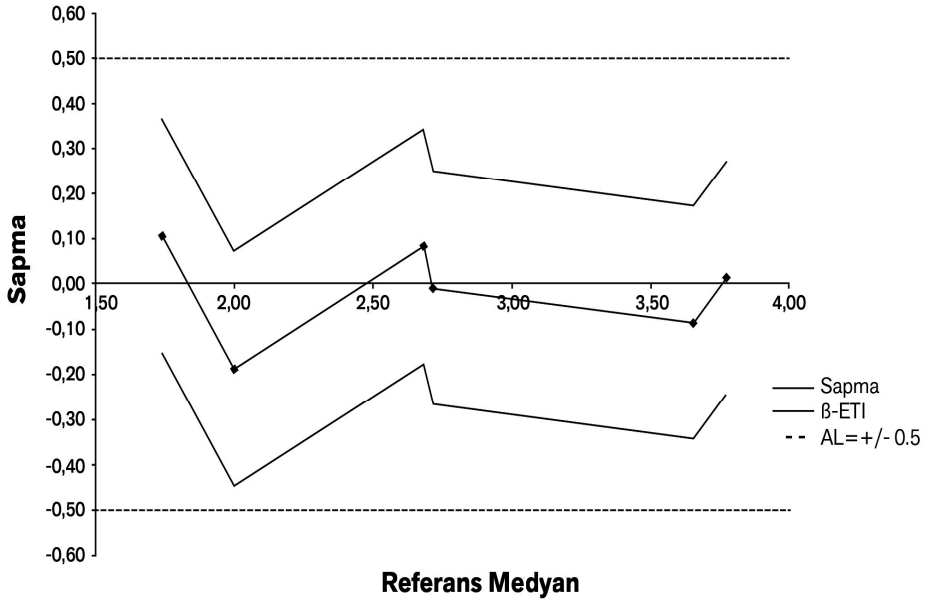
Eğer i'inci doğruluk profilinde $U_i \leq AL_s$ ve $L_i \geq -AL_s$ ise alternatif metot ile referans metot, ilgili kategori tiplerinde ya da toplam kategorilerde eşdeğerdir. Eğer $S_{ref} \leq 0{,}125$ ise yeni kabul limitleri 0,5'den küçük veya eşittir.

Tek ve tüm kategorilerde limitlere uygun verilerin elde edilmesi durumunda alternatif metot referans metot ile eşdeğerdir.

Tayin Limiti Çalışması

Ölçüm prensibinin koloni sayım tekniği temeline dayanmayan, iletkenlik, floresan ölçümü gibi mikroorganizmaların büyümesi tekniğine dayanan alternatif metotlarda tayin limitinin (LOQ) belirlenmesi gerekir [2].

Doğruluk profili çalışmasında kullanılan kategori ve tiplerde çalışma yürütülür. Her kategori ve tipte kör numunelerde, aynı örneğin minimum 10 test porsiyonunda çalışma yapılır. Bu kör numuneler alternatif metodun LOQ değerinin doğrulaması için kullanılır. Sonuçların Log_{10} değerleri üzerinden standart sapması hesaplanır, LOQ değeri standart sapmanın 10 katıdır [2].



Şekil 13.07. Metot karşılaştırma çalışmalarında doğruluk profili çalışma örneği

$$s_0 = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{j=1}^{n}(y_j - \bar{y})^2} \quad (23)$$

LOQ = 10s₀

n = Kullanılan toplam test porsiyonu sayısı

y_j = j test porsiyonunun Log_{10} sonucu

$\bar{y}$ = Tüm sonuçların Log_{10} çevriminin ortalaması

Dâhililik ve Haricilik Çalışması

Dâhililik ve haricilik çalışması sayım yapılan spesifik mikroorganizma metotları için yapılmalıdır. Toplam canlı sayısı veya maya küf metotları gibi genel sayım metotlarında çalışmanın yapılması gerekli değildir [2].

Çalışmada kullanılacak test suşlarının seçimi ISO 16140-2 Ek E'de belirtilmiştir. Seçilecek suşlar alternatif metodun ölçüm prensibine göre belirlenir. Değişik ölçüm prensipleri değişik test panel suşlarının kullanımını gerektirir.

Her bir suş biyokimyasal ve/veya serolojik ve/veya genetik olarak karakterize edilmelidir. Geçerli kılma kapsamı göz önüne alınarak tercihen gıda, yem ve

üretim alanlarından izole edilen suşlar kullanılmalıdır. Bununla birlikte klinik, çevre ve kültür koleksiyonları suşları da kullanılabilir [2].

Dâhililik çalışması için en az 50 saf kültür (hedef) mikroorganizma, haricilik çalışması için en az 30 saf kültür (hedef olmayan) mikroorganizma test edilmelidir [2].

Kültüre edilmesi zor veya mümkün olmayan bazı mikroorganizmaların test suşlarının saf süspansiyonları zenginleştirme için kullanılmalıdır [2].

Dâhililik ve haricilik çalışması için yeterli sayıda test mikroorganizmasının bulunması mümkün olmadığı durumlarda, geçerli kılma çalışmasına katılan tüm taraflarca yapılan anlaşma ile bu suşların seçimi yapılmalıdır [2].

Dâhililik çalışmasında her bir test bir kere alternatif ve referans metot ile seçici olmayan bir besiyerinde çalışılır. İnokülüm alternatif metodun minimum tespit seviyesinin 100 katı olacak miktarda yapılır. Alternatif metot olarak petri metodu kullanılıyorsa inokülasyon seviyesi petride sayılabilir bir düzeyde olmalıdır. Eğer sonuçlar negatif ise ek numunelerle çalışmalar tekrar edilmelidir [2].

Haricilik çalışmasında her bir test bir kere alternatif ve referans metot ile çalışılır. İnokülüm, kullanılan kategoride beklenen kontaminasyon seviyesinde yapılmalıdır. Saf kültür, içinde numune bulunmayan ve seçici olmayan bir sıvı besiyerinde optimum koşullarda en az 24 saat geliştirilir ve testin öncesinde uygun şekilde seyreltilir [2].

13.02.02. Su Numunelerinde Mikrobiyolojik Analizlerde Geçerli Kılma

Su ile ilgili mikrobiyolojik metotların geçerli kılma ve doğrulama çalışması ISO 13843 standardında tanımlanmıştır. Standardın her türlü su numunesi uygulanan kantitatif metotlar için hazırlandığı vurgulanmıştır. Standart kurum içi geçerli kılma ve doğrulamayı içermekte olup kolaboratif çalışma kapsamında yer almamaktadır [3].

Kantitatif metotlar sayıma dayalı olup koloni sayımı, mikroskobik sayım ve en muhtemel sayı gibi farklı teknikleri içeren metotların geçerli kılma çalışmalarında bu standart kullanılabilir. Ayrıca yeni teknikler olan FISH (in situ hibridizasyon), PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi metotlar için de kullanılabilmektedir. Ancak bu metotlara özgü spesifik gereklilikler ayrı olarak değerlendirilmelidir [3]. Standardın içinde belirtilen performans özellikleri ve bunların geçerli kılma ve doğrulama ayrımı Çizelge 13.08'de belirtilmiştir.

Çizelge 13.08. Su mikrobiyoloji metotları için performans özellikleri [3]

Performans Özellikleri	Geçerli Kılma	Doğrulama	Değerlendirme
Hassasiyet	Evet	Evet	Genel olarak >%90
Spesifiklik	Evet	Evet	Genel olarak >%80
Yanlış pozitif oranı	Evet	Evet	
Yanlış negatif oranı	Evet	Evet	
Seçicilik	Evet	Evet	Seçicilik %10'dan düşükse sonuçlar geçerli değildir
Verimlilik	Evet	Evet	
Maksimum üst limit	Evet	Hayır	Membran filtrasyon metotlarında tipik olarak 0 kob ile 80 kob arasındadır. Bu değer petri sayım metotlarında 90 mm'lik petri kullanımında 0 kob ile 300 kob olacaktır. Bu üst limit numunedeki mevcut floraya, değişik tip hedef mikroorganizma sayısına ve koloni büyüklüğüne bağlıdır.
Tekrarlanabilirlik	Evet	Evet	Varyasyon Poisson dağılımı içinde olmalıdır. Eğer değilse yüksek dağılım derecesi verilmelidir.
Tekrarüretilebilirlik (Ara kesinlik)	Evet		
Sağlamlık	Evet		
Bağıl geri kazanım	Evet		
Sayımın belirsizliği	Evet	Evet	Bir analist için sayım belirsizliğinin normalde $U_{rel} = \pm 0,03$'ten küçük olması beklenir. Laboratuvar içi sayım belirsizliği genel olarak $U_{rel} = \pm 0,05$'ten küçük olur. Eğer bu değer 0,1'den yüksek ise bir problemin göstergesidir.

13.02.02.01. Kategorik Performans Özellikleri

Kategorik performans özellikleri başlığı altında yapılan çalışma ile hassasiyet, spesifiklik, verimlilik, seçicilik, yanlış pozitif oranı ve yanlış negatif oranı hesaplanabilmektedir [3].

Hassasiyet, metodun hedef organizmaları tespit etme kabiliyetidir. Spesifiklik, analitik bir yöntemin hedef organizmaları diğer organizmalardan ve numunede bulunan girişim yapan maddelerden ayırt etme yeteneğidir. Verimlilik, pozitif ve negatif kolonilerin doğru olarak belirlenme oranıdır. Seçicilik, numunedeki hedef koloni sayısının toplam koloni sayısına oranıdır. Yanlış pozitif oranı, hedef mikroorganizma bulunmadığı halde pozitif sonuç elde etme oranıdır.

Yanlış negatif oranı, hedef mikroorganizma bulunduğu halde negatif sonuç elde etme oranıdır [1, 3, 5].

Çalışma için test porsiyonu içinde 20-80 mikroorganizma bulunan numuneler hazırlanır. Numuneler analiz talimatına göre çalışılır. Tipik ve atipik koloniler sayılır ve uygun prosedürler kullanılarak kolonilerin tanımlanması yapılır [3].

Mümkünse uygun seviyede, mevcutsa doğal kontamine numune kullanılmalıdır. Ancak her zaman bu şekilde numune bulmak pek mümkün olmamaktadır. Bu durumda kirletilerek numune hazırlanabilir. Kirletme işleminde gerçek numuneyi temsil edecek şekilde hedef olmayan mikroorganizmaların da eklenmesi faydalı olacaktır [3].

Değişik kaynaklardan olacak şekilde minimum 20 numune çalışılmalıdır. Kirletme için yüzey veya lağım suyu kullanıldığında en az üç farklı kaynaktan elde edilmiş olması önemlidir. Çalışma esnasında yeterli sayıda atipik koloni incelemesi yapılmalıdır. Ancak metot çok seçici ise bunun uygulamasının zor olduğu bilinmelidir [3].

İnkübasyon sonucunda petride görülen tüm koloniler analiz metodunda belirtilen doğrulama yöntemine göre doğrulanır. Eğer metotta bir doğrulama basamağı bulunmuyorsa sonuçlar doğrulanmamış pozitif veya negatif olarak kaydedilir. Ancak kategorik özellikler olan hassasiyet, spesifiklik, yanlış pozitif ve yanlış negatif hesabının yapılabilmesi için elde edilen sonuçların doğru veya yanlış olarak değerlendirilebilmesi gerekir. Bu durumda adı ikincil doğrulama olan bir doğrulama testine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu şekildeki çalışma hazır ticari kitleri, fenotipik metotları, kimyasal kompozisyonun test edilmesini (örneğin MALDI-TOF) veya moleküler metotları kapsayabilir [3].

Tüm kolonilerin doğrulanması sonrasında verilerin değerlendirilmesi dört faklı kategoride yapılabilir ve bu kategorilerin sıklığı 2X2 diyagramı ile değerlendirilir [3].

a) Tipik koloniler, hedef mikroorganizma olarak doğrulanır (doğru pozitif).

b) Atipik koloniler, hedef mikroorganizma olarak doğrulanır (yanlış negatif).

c) Tipik koloniler, hedef mikroorganizma olarak doğrulanmaz (yanlış pozitif).

d) Atipik koloniler, hedef mikroorganizma olarak doğrulanmaz (doğru negatif).

Çizelge 13.09. 2X2 çapraz tablo ile kategori karşılaştırma

		Varsayılan koloniler		
		Pozitif	Negatif	
Doğrulanmış kolonilerin sonuçları	Pozitif	a	b	a+b
	Negatif	c	d	c+d
		a+c	b+d	n

Toplam test edilen numune sayısı = a+b+c+d=n (24)

Hassasiyet = a/(a+b) (25)

Spesifiklik = d/(c+d) (26)

Yanlış pozitif oranı = c/(a+c) (27)

Yanlış negatif oranı = b/(b+d) (28)

Seçicilik = a/n (29)

Verimlilik = (a+d)/n (30)

EMS metotlarında aynı yaklaşım uygulanabilir; "koloni" terimi burada "temsili alınan miktar", "tipik" terimi "pozitif", "atipik" terimi "negatif" olarak değiştirilebilir.

13.02.02.02. Maksimum Üst Limitin Belirlenmesi ve Alt Limitinin Değerlendirilmesi

Çalışma Aralığı

Metot çalışma aralığı orijinal standardında ve ticari ürünlerde üretici tarafından tanımlanır. Ancak bu değerler her zaman kesin olmayıp numune tipine göre değişkenlik göstermektedir.

EMS tabanlı metotlarda çalışma aralığı, kullanılan numune miktarı ile belirlenir. Tüm seyreltmelerde tüm tüplerin pozitif bulunması durumunda pratik üst limit aşılmış olur [3].

Çalışma aralığının belirlenmesi için doğal kontamine numuneler, saf kültürler veya hedef mikroorganizma içeren kontamine materyal ile kirletme yapılarak oluşturulmuş numuneler kullanılabilir. Minimum 20 numune gerekmektedir. Lağım suyu veya yüzey suyunun kullanıldığı durumlarda en az üç kaynak kullanılmalıdır [3].

Çalışma aralığı aynı petride iki mikroorganizma arandığında daha komplike olmaktadır. Örneğin aynı membran filtrasyon metodu ile toplam koliform ve *E. coli* tespitinde her birinin ayrı çalışma aralığı olabilir. Bu tip metotların çalışma aralığı *E. coli*'nin diğer koliformlara oranının numuneden numuneye değişkenlik göstermesi nedeniyle hedef kolonilerin toplamı üzerinden raporlanır [3].

Uygulamada diğer bir çelişki yaratabilecek durum, prosedürün seçiciliğidir. Örneğin toplam koliform ve/veya *E. coli* tespiti için membran filtrasyon metotlarının zayıf seçiciliği olduğundan birçok hedef olmayan mikroorganizmanın da üremesi mümkün olabilmektedir. Bu mikroorganizmalar hedef mikroorganizmaların varlığını örtebildiğinden veya inhibe edebildiğinden çalışma aralığını da yüksek seviyede etkileyebilmektedir [3].

Linearite ile İlişkili Üst Limit

Koloni sayım metotlarında kesinlik, gözlenen koloni sayısının artışı ile uyumlu bir şekilde iyileşir. Ancak yoğun üremelerden dolayı petri kutusu ya da membran filtrede bir seviyeden sonra mikroorganizma sayısı belirlenemez hale gelebilir.

Deneysel olarak iyi hazırlanmış bir seri seyreltme veya hacimler kullanılarak yapılan tekrar çalışmaları sonucunda üst limit belirlenebilir. Dikkatlice karıştırılmış sıvı numune ile varsayılan üst limiti aşacak bakteri yoğunluğuna gelecek şekilde ilk seyreltim hazırlanır. Bu seyreltmeden seri halde 1:2 oranında altı veya yedi kez seyreltmeler yapılır. Her bir seyreltmeden de (R) üç paralel ekim yapılır. İnkübasyon sonrasında 20'den fazla koloni olan petriler (x) okunur [3].

Veriler orantılılık ve yüksek yayılma yönünden analiz edilir. İstatistiksel analiz olarak G^2 testi aşağıdaki formüle göre uygulanır. Elde edilen sonuç X^2 tablosunda n-1 serbestlik derecesi değeri ile karşılaştırılır. Teorik değerin %1 ve %5 limiti aşması durumunda en küçük (2^{-1}) seyreltideki değerler çıkarılarak yeniden hesap yapılır. Limitlerin altında kalan son seyreltiye kadar hesaplamaya devam edilir ve bu seviye, yani linearitenin üstündeki dilüsyonlarda sağlanamayan koloni sayısı üst limit olarak belirlenir. Bu yaklaşım sadece koloni metotlarına uygulanabilir [3].

$$G^2_{n-1} = 2\left[x_1 In\frac{x_1}{R_1} + x_2 In\frac{x_2}{R_2} + \cdots + x_n In\frac{x_n}{R_n} - \left(\sum x\right) \times In\left(\frac{\sum x}{\sum R}\right)\right] \qquad (31)$$

Alt Limitlerin Değerlendirilmesi

Tespit limiti güvenilir olarak, yani %95 olasılıkla belirlenebilecek en düşük analit konsantrasyonudur. Olasılık üzerinden veya konsensüs bağıl standart sapma kullanılarak alt limitler hesaplanabilmektedir [3].

Olasılığa dayalı tespit seviyesi

Poisson modeli

Poisson dağılımında pozitif sonuç *p*(+) olasılığı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır [3].

$$p(+) = 1 - e^{-x} \quad (32)$$

$$x = -ln[1 - p(+)] \quad (33)$$

e= doğal logaritma

χ = her bir analitik porsiyondaki partikül sayısı

Konsantrasyondaki tespit seviyesi, analitin varlığının %95 olasılıkla tespit edildiği seviyedir. Bu durumda *p*(+)= 0,95 olacaktır.

x= -*ln*(1 - 0,95)= -*ln*(0,05)= 3,0

Eşitlikten hesaplan 3 değeri (test porsiyonundaki partikül sayısı) 0,95'e eşdeğer olan analit varlığının tespit şansıdır. Bu değer bir metottan diğerine değişiklik göstermez. Tüm koloni sayım metotları için aynı miktardaki test porsiyonu için aynı değerdir.

Yüksek dağılımın negatif binomial modeli

Tespit seviyesi aynı zamanda negatif sonuçların hesaplanabilme olasılığı ile de tanımlanmaktadır [3].

$$p(-) = (1 + u_0^2 \bar{x})^{\frac{1}{u_0^2}} \quad (34)$$

$$\bar{x} = \frac{p(-)^{-u_0^2} - 1}{u_0^2} \quad (35)$$

(u_0^2) = operasyonel varyans

Tespit seviyesi orta seviyede yüksek dağılım olduğu zaman düşük oranda etkilenmektedir. Bakteriyel konsantrasyonun %95 olasılıkla pozitif sonuç verebilmesi, yüksek dağılım durumunda yukarıda bulunan formülden de anlaşılacağı üzere bağıl operasyonel varyansa (u_0^2) bağlıdır. Bağıl operasyonel standart sapmanın u_0= 0,30 olduğu varsayıldığında negatif sonuç olasılığı, yani *p*(–)= 1 – *p*(+)= 1 – 0,95 = 0,05 olacaktır. Bu durumda porsiyondaki analitik partikül sayısı da

$\bar{x} = \frac{0{,}05^{-0.09} - 1}{0{,}09} = 3{,}44$ olacaktır.

Kesinliğe dayalı tayin limiti

Spesifik olarak tanımlanan bir bağıl belirsizlik değerini sağlayacak ortalama konsantrasyon, koloni sayılarının kesinlik formülü kullanılarak hesaplanabilir [3].

Poisson modeli

Poisson modeli için kullanılacak formül;

$$\chi = 1 / u^2_{rel} \quad (36)$$

χ = gözlenen koloni sayısı

U_{rel} = bağıl standart sapma

Örneğin, %20 bağıl kesinlik seviyesine Poisson dağılımında ulaşılacak koloni sayısı yukarıdaki formül kullanılarak $\chi = 1/0{,}2^2 = 1/0{,}04 = 25$ olarak hesaplanacaktır.

Negatif binomial model

Negatif binomial modeli için kullanılacak formül;

$$\overline{x} = \frac{1}{u^2_{rel} - u^2_0} \quad (37)$$

$\overline{x}$ = ortalama koloni sayısı

u_{rel} =hedef bağıl kesinlik (bağıl standart sapma)

u_0 =bağıl operasyonel standart sapma

Yukarıda sunulan örnek üzerinden hareket edildiğinde bağıl operasyonel standart sapmanın 0,15 olduğu düşünülürse;

$$\overline{x} = \frac{1}{0{,}2^2 - 0{,}15^2} = \frac{1}{0{,}04 - 0{,}0225} = \frac{1}{0{,}0175} = 57$$

olarak hesaplanacaktır.

13.02.02.03. Kesinliğin Değerlendirilmesi Tekrarlanabilirlik ve Tekrarüretilebilirliğin Hesaplanması

Laboratuvarlar metotların doğrulanması ve daha sonra analitik kalite kontrol sistemlerinin kurulması için tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik verilerine ihtiyaç duyduklarından yeni metotlar yayınlanırken bu verilerin sağlanması önemlidir.

Kesinlik iki farklı koşulda değerlendirilir:

-Tekrarlanabilirlik, aynı örneğin aynı koşullar altında çalışıldığında elde edilen ölçümler arasındaki değişkenliği yansıtır. Mikrobiyolojik analizlerde bu koşullar altında beklenen, sonuçların Poisson dağılımına uygun olmasıdır. Ancak her zaman pratikte bu görülmez ve yüksek dağılım şekillenebilir. Yüksek dağılım paralel ölçümlere dayalı bir deney deseni üzerinden hesaplanabilmektedir [3].

-Tekrarüretilebilirlik, aynı metodun değişik laboratuvarlarda değişik koşullar atında çalışıldığında elde edilen ölçümler arasındaki değişkenliği yansıtır. Teorik olarak tekrarüretilebilirlik kimyasallar, analistler, laboratuvarlar ve çevre koşullarının farklılığının etkisini kapsamaktadır. Tekrarüretilebilirlik için mikrobiyolojik analizlerde bağıl operasyonel varyans hesaplanır. Üçüncü bir kesinlik çalışması ise aynı laboratuvarda analist, ekipman, materyal değişkenliği sağlayarak ölçümler yapılmasıdır. Buna laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik veya ara kesinlik denilmektedir [3].

Tekrarlanabilirlik

Çalışma için aynı numune tekrarlanabilirlik koşulları altında (aynı analist, aynı gün, aynı zaman ve aynı inkübatör kullanılarak) 10 paralel olarak çalışılır. Farklı kaynaklardan gelen mikroorganizmalar kullanarak en az 3 tekrarlanabilirlik verisi seti hazırlanmalıdır.

Elde edilen sonuçların aritmetik ortalaması, varyansı, bağıl operasyonel varyansı ve Poisson dağılımı kontrolü aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanır.

Aritmetik ortalama;

$$\overline{x} = \frac{\Sigma x_i}{10} \tag{38}$$

$\overline{x}$ = Aritmetik ortalama

χ_i=i'ninci gözlenen koloni sayısı

Varyans;

$$s^2 = \frac{\Sigma(x_i - \overline{x})^2}{n-1} \tag{39}$$

S^2= Varyans

Standart sapma (sd);

$$sd = \sqrt{\frac{\Sigma_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}{n-1}} \tag{40}$$

Dağılımın Poisson göstergesi;

$$\chi^2_{r-1} = \frac{r \sum x_i^2}{\sum x_i} - \sum x_i \quad (41)$$

r; paralel sonuçların sayısı

x_i; i inci gözlenen koloni sayısı (i=1 ….. r)

Dağılımın Poisson göstergesi testi elde edilen sonuçların yüksek dağılım olup olmadığını belirler. Bu durumda;

-Hesaplanan değer %5 limit değerinin altında ise Poisson dağılımında anlamlı bir fark yoktur.

$$X^2_{r-1} < X^2_{r-1;0,05}$$

-Hesaplanan değer %5 limit değerinin üstünde ancak %1 limit değerinin altında ise dağılım Poisson dağılımından anlamlı olarak büyüktür.

$$X^2_{r-1;0,05} < X^2_{r-1} < X^2_{r-1;0,01}$$

-Hesaplanan değer %1 limit değerinin üzerinde ise dağılım Poisson dağılımından yüksek anlamlı olarak büyüktür.

$$X^2_{r-1;0,01} < X^2_{r-1}$$

Dağılımın Poisson olup olmadığı ve yüksek dağılımın varlığının kontrolü için yukarıdaki eşitlik dışında olabilirlik oranı testi de yapılabilir.

Bağıl operasyonel varyans;

$$u_o^2 = \frac{s^2 - \bar{x}}{\bar{x}^2} \quad (42)$$

s^2= paralel sonuçların varyansı

$\bar{x}$ = paralel sonuçların aritmetik ortalaması

Formülasyonun verilerle örneklenmiş hali Çizelge 13.10'da verilmiştir.

Ara Kesinlik

Ara kesinlik için aynı zamanda laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik terimi de kullanılabilmektedir. Aynı laboratuvar içinde tekrarların mümkün olduğunca değişik koşullarda gerçekleştirilmesi ile sağlanır. Çalışma için ISO 29201'de tanımlanan deney deseni kullanılabilir. Bu deney desenine göre, değişik günlerde değişken koşullar sağlanarak 30 adet iki paralel ölçüm elde edilir. Bu

ölçümlerin aritmetik ortalaması ve varyansı hesaplanır. Bağıl operasyonel varyans (u_0^2) aynı tekrarlanabilirlikte olduğu gibi formül 41 kullanılarak hesaplanır [3], [8].

Her bir çift ölçümün bağıl operasyonel varyansların ortalaması alınır. Bunun karekökünün yüz ile çarpımı ara kesinlik olarak hesaplanır. Aşağıda ISO 13843'de yar alan örnek formülleri bulunmaktadır (Çizelge 13.10, Denklik 43).

Çizelge 13.10. Ara kesinlik çalışması için koloni sayım sonuçları ve hesapları

Numune	Tekrarlar		Aritmetik ortalama	Varyans	Bağıl operasyonel varyans
	x_1	x_2			
1	34	23	28,5	60,5	0,039
2	17	15	16	2	-0,055
3	11	27	19	128	0,302
4	40	21	30,5	180,5	0,161
5	42	25	33,5	144,5	0,099
6	43	38	40,5	12,5	-0,017
7	25	12	18,5	84,5	0,193
8	34	28	31	18	-0,014
9	58	39	48,5	180,5	0,056
10	37	48	42,5	60,5	0,010

$$\bar{u}_0^2 = 0{,}078$$

$$Ara\ kesinlik = \sqrt{\bar{u}_0^2} \times 100 \tag{43}$$

$$Ara\ kesinlik = \sqrt{\bar{u}_0^2} \times 100 = \%\ 27{,}8$$

EMS metotlarında da aynı deney deseni kullanılmaktadır. Hesaplama için kullanılan formüller ve ISO 13843'de yer alan örneğin çözümü aşağıda sunulmuştur.

$$u_{d1}^2 = \left(\frac{lgT_{1,1} - lgT_{0,1}}{3{,}92}\right)^2 \tag{44}$$

$$u_{d2}^2 = \left(\frac{lgT_{1,2} - lgT_{0,2}}{3{,}92}\right)^2 \quad (45)$$

$$u_d^2 = \frac{u_{d1}^2 + u_{d2}^2}{2} \quad (46)$$

$$u_o^2 = u_R^2 - u_d^2 \quad (47)$$

u_{d1}^2 = İlk paralel için iç değişken/dağılım belirsizliği

u_{d2}^2 = İkinci paralel için iç değişken/dağılım belirsizliği

$T_{0,1}$, $T_{0,2}$= alt %95 güven limiti

$T_{1,1}$, $T_{1,2}$= üst %95 güven limiti

Lg = bayağı logaritma

Çizelge 13.11. Ara kesinlik çalışması için EMS sonuçları ve hesapları

Numune no	x_1	$T_{0,1}$	$T_{1,1}$	x_2	$T_{0,2}$	$T_{1,2}$	u_R^2	u_{d1}^2	u_{d2}^2	u_d^2	u_o^2
1	600,1	419,3	858,9	176,1	97,2	319,1	0,1418	0,0063	0,0173	0,0118	0,1299
2	2086,6	1560,4	2790,4	1148,4	850,7	1550,3	0,0336	0,0041	0,0044	0,0043	0,0293
3	1885,3	1413,0	2515,5	1362,8	1017,3	1825,5	0,0099	0,0041	0,0042	0,0041	0,0058
4	76,8	31,9	184,9	110,0	52,5	230,6	0,0122	0,0379	0,0269	0,0324	-0,0202
5	1672,6	1254,0	2230,9	2094,8	1566,3	2801,6	0,0048	0,0041	0,0042	0,0041	0,0007
6	799,8	576,6	109,5	311,8	196,4	494,9	0,0837	0,0053	0,0105	0,0079	0,0758
7	196,7	111,8	346,3	143,8	74,9	276,2	0,0093	0,0157	0,0209	0,0183	-0,0090
8	1202,0	892,5	1618,7	1316,6	981,6	1765,8	0,0008	0,0044	0,0042	0,0043	-0,0035
9	7100,7	4488,8	11232,5	7682,9	4845,4	12181,9	0,0006	0,0103	0,0104	0,0104	-0,0098
10	7682,9	4854,4	12181,9	3421,3	2450,4	4777,0	0,0617	0,0104	0,0055	0,0079	0,0538
Ortalama							0,0358			0,0106	0,0253

$$u_{0rel}^2 = 5{,}302 \times 0{,}0253 = 0{,}1340$$

$$Ara\ kesinlik = \sqrt{u_{0rel}^2} \times 100 = \%36{,}6$$

13.02.02.04. Sağlamlık

Sağlamlık, laboratuvar ortamında kaçınılmaz olarak meydana gelebilecek değişkenliklerin veya prosedürdeki ufak değişikliklerin metot tarafından tolere edilmesidir. Çalışmanın hedefi metodun amaca uygunluğun sağlanabilmesi için limitlerin belirlenmesidir [3].

Doğal veya kirletilmiş numunelerde değişken koşullarda iki paralel olarak çalışma yapılır. Örneğin metot prosedüründe inkübasyon sıcaklığı 35±1°C, 18-22 saat olarak belirtilmişse, çalışma 34°C ve 36°C'de yürütülür ve 18. saatte ve 22. saatte okuma yapılır. Her bir parametre için en az 30 veri toplanmalıdır. Veriler en az üç farklı kaynaktan gelen mikroorganizmalar kullanılarak toplanmalıdır. Verilerin analizinde, grafik metotları veya girişimin analiz edilebilmesi için parametrik veya parametrik olmayan istatistiksel testler kullanılabilir [3].

13.02.02.05. Bağıl Geri Kazanım

Mikrobiyolojik analizlerde mutlak gerçekliğin ispatlanması mümkün değildir. Gerçek değerin belirlenmesi amacıyla yapılabilecek en ideal çalışma için sonuç başka bir metotla belirlenebilir, sertifikalı referans materyallerde verilen ortalama değer veya farklı laboratuvar sonuçlarının ortalaması üzerinden elde edilen ve uzlaşılan değer kullanılabilir [3].

Kantitatif metotlarda sapmanın belirlenebilmesi için en uygun yöntem referans değer ile geri kazanımın karşılaştırılması, yani bağıl geri kazanımın hesaplanmasıdır. Karşılaştırma çalışması için ISO 11133 ve ISO 7704 standartlarından faydalanılabilir [3], [7], [9].

Geri kazanım çalışması için saf kültürler ve seçici olmayan metotlar için steril edilmiş zenginleştirilmiş numuneler veya referans materyaller kullanılabilir. Birincil tercih her zaman doğal kontamine numunelerin kullanılmasıdır. Alternatif olarak zenginleştirilmiş numuneler ile çalışılır. Zenginleştirme yapılacak çalışmalarda en az üç değişik organizma kaynağı kullanılmalı ve minimum 30 veri toplanmalıdır. Farklı mikrobiyolojik metotların geri kazanımı matrikse göre değişiklik gösterdiği için, yapılan çalışmalarda farklı matriksler kullanılmalıdır. Subjektif yorumlamanın olmaması için karşılaştırma doğrulanmış koloniler üzerinden yapılmalıdır. Bağıl geri kazanım çalışması için ISO 17994 standardında hem koloni sayımı hem de EMS metotları için prosedür tarif edilmiştir [3], [10] .

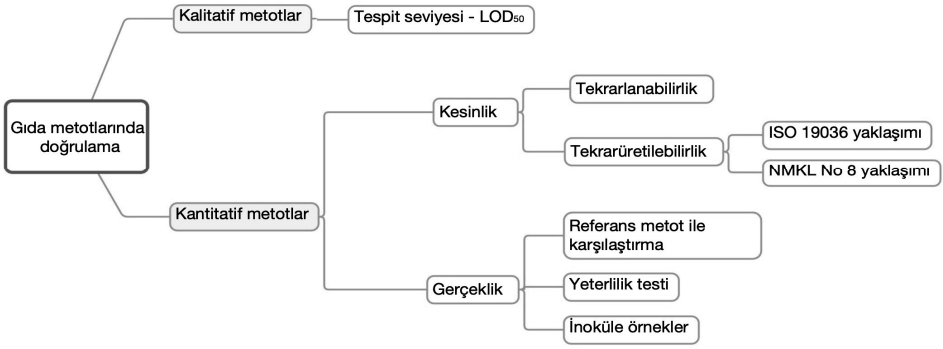
13.03. Metotların Doğrulaması

Laboratuvarlar kullanıma almadan önce, bir metodu gerçekleştirebildiğini teyit etmeli, yani doğrulamalıdır. Bu, metodun laboratuvar içinde amaca uygun olmasını sağlamak için ilgili performans özelliklerinin değerlendirilmesini içerir [1].

Doğrulama işlemi, uluslararası kabul görmüş bir protokole *göre geçerli kılınmış metotlara* ve çok iyi bir şekilde dizayn edilmiş, performans özellikleri belirlenmiş ancak *geçerli kılınmamış olan standardize edilmiş referans metotlara* uygulanabilir [1]. Alternatif metotlarda geçerli kılma işlemi yapılmamışsa metot doğrulaması uygulanamaz.

13.03.01. Gıda, Yem ve Çevre Numunelerinde Mikrobiyolojik Analizlerde Doğrulama

Gıda numunelerinde mikrobiyolojik analiz metotlarının doğrulaması NMKL No 32 rehberinde belirtilmiştir [1]. Konu ile ilgili ISO 16140-3 standardı hazırlanmakta olup henüz komite taslağı aşamasındadır. Doğrulama basamakları Şekil 13.08'de özetlenmiştir.



Şekil 13.08. Gıda metotlarında doğrulama parametreleri

Analitik metodun performansı, örneğin yapısı ve doğal florası gibi iç faktörlere göre değişkenlik göstermektedir [1]. Bu bağlamda;

-PCR inhibitör içeren gıda numuneleri (örneğin kolza tohumu), metodun tespit limitini etkileyebilir,

-Yoğun renge sahip bir baharat, spektrofotometrik tekniklere/ tekniklere dayalı yöntemlere girişim yapabilir,

-Doğal olarak oluşan enzimler, enzimatik metotları etkileyebilir,

-Hedef mikroorganizma dışındaki mikroorganizmaların yoğun bir şekilde bulunması, hedef mikroorganizmanın tespit edilebilmesini engelleyebilir.

Doğrulama çalışmasında kullanılacak numune tipleri, geçerli kılma kapsamının birebir aynısı olmak zorunda değildir. Ancak aynı tip ve kategorilere uygun olarak seçilmelidir.

13.03.01.01. Kalitatif Metotlar

Tespit Seviyesi (LOD) Çalışması

Tespit seviyesi, tespit olasılığının x olduğu belirli bir ölçüm prosedürüyle elde edilen ölçülen analit konsantrasyonudur [1]. Örneğin LOD_{50}, testlerin %50'sinin pozitif sonuç verdiği tespit seviyesidir. Tespit seviyesi kalitatif metotların doğrulaması için en önemli basamaktır. Numuneler laboratuvarda rutin olarak incelenen gıda matriksleriyle uyumlu olmalıdır. Numunelerin hazırlanması için yapılacak kirletme çalışması Bölüm 13.04'de tariflenmiştir.

Kullanılan metodun kapsamına göre çalışılması gereken numune adetleri Çizelge 13.12'de sunulmuştur.

Çizelge 13.12. Doğrulama kapsamına uygun olarak LOD çalışmasında gerekli minimum numune sayısı [1]

Kategori sayısı	Temsili numune	İnoküle edilen ve edilmeyen numune sayısı	Minimum çalışılması gereken numune sayısı
1 kategori	2 temsili numune	6 adet 2 seviyede inokülasyon yapılmış, 2 adet inoküle edilmemiş numune	16 numune 8 X 2 kategori = 16 numune
2 kategori	1-2 temsili numune	6 adet 2 seviyede inokülasyon yapılmış, 2 adet inoküle edilmemiş numune	24 numune 1 kategoride 8, ikinci kategoride 16 numune
3-4 kategori	1-2 temsili numune	6 adet 2 seviyede inokülasyon yapılmış, 2 adet inoküle edilmemiş numune	32 numune 8 numune X 4 kategori = 32 numune 3 kategoride çalışma yapıldığında 1 kategoride 8 X 2 = 16 numune
≥ 6 kategori	1 temsili numune	6 adet 2 seviyede inokülasyon yapılmış, 2 adet inoküle edilmemiş numune	48 numune 8 numune X 6 kategori = 48 numune

Buna göre;

-tek bir kategoride çalışma yapılıyorsa temsili 2 numune,

-iki kategoride yapılan çalışmalarda bir kategoride 2, bir kategoride 1 temsili numune,

-üç-dört kategoride yapılan çalışmalarda her bir kategoride 1-2 temsili numune,

-geniş bir kapsama sahip metotlarda ≥ 6 kategoride ve her birinde 1'er temsili numune ile çalışma yapılır.

Her bir kategoride belirlenen temsili numunelerden 6 tanesine inokülasyon yapılır, 2 tanesine inokülasyon yapılmaz. İnokülasyonun iki farklı seviyede yapılması önerilir. İlk seviye geçerli kılma çalışmalarında tespit edilmiş ve standart metodun içinde yer alan LOD_{50} seviyesine yakın bir seviyede, ikinci ise bu seviyenin 5-10 katı olacak şekilde planlanır [1].

Eğer kapsamda hayvan yemi ve çevre yüzey numuneleri de bulunuyorsa bu kategorilerin de doğrulanması gerekir. Her bir kategoride en az iki temsili numune çalışılmalıdır [1].

Kabul kriteri olarak LOD_{50} seviyesinde yapılan inokülasyonda her 3 numuneden en az birinde hedef tespit edilebilmelidir. Daha üst seviyede ise tüm numuneler pozitif olarak tespit edilebilmelidir. Eğer kabul kriterleri karşılanamıyorsa metodun uygulanışı gözden geçirilir, inokülum ve numuneler yeniden hazırlanır, tercihen yeniden çalışma yapılır [1].

ISO 16140-2'de belirtilen ve yukarıda geçerli kılma başlığında aktarılan Wilrich&Wilrich Excel dosyası doğrulama amacıyla da kullanılabilir. Hesaplamada kullanılabilecek diğer bir yöntem Spearman-Kaerber metodu ile aşağıdaki formül kullanılarak LOD_{50} değeri elde edilebilir [11].

$$LOD_{50} = e^{m} \tag{48}$$

$$m = \sum_{i=1}^{k-1} p(i) + ((p(i+1) - p(i)) \times (x(i) + x(i+1))/2) \tag{49}$$

k= mikroorganizma seviyesi sayısı

p(*i*)= her bir seviyedeki, i(i=1,2,3) pozitif oranı – her seviyedeki hassasiyet

$x(i) =$ mikroorganizma seviyesinin (i) doğal logaritması (LN)

Diğer Performans Özellikleri

Laboratuvar, doğrulama çalışması için metodun uygulanması ile ilgili daha fazla bilgi sağlamak isterse spesifiklik ve seçicilik parametrelerini geçerli kılma kayıtları ile karşılaştırma için çalışabilir. Ancak doğrulamada bu çalışmalar zorunlu kılınmamıştır [1].

Spesifiklik: Metot uygulama talimatında, hedef mikroorganizma dışındaki diğer mikroorganizmalardan veya matriksle ilgili bileşenlerden kaynaklanan girişim

riskinin bulunduğu belirtiliyorsa laboratuvar spesifikliği / relatif spesifikliği yeniden değerlendirebilir [1].

Seçicilik: Birincil validasyon çalışması, diğer mikroorganizmalar ile bir çapraz reaksiyon oluşabileceğini işaret ediyorsa veya bir suşun tespit edilebilmesi ile ilgili şüphe etmeyi gerektiren bir durum varsa dâhililik ve haricilik çalışması saf kültürler ile laboratuvarda yeniden değerlendirilebilir [1].

Sağlamlık: Metodun doğası itibariyle, bazı sağlamlık çalışmalarının yapılması yararlı olabilir (Örneğin sıcaklık ve pH ile ilgili durumlar, sıvı besiyerlerinin soğukta muhafaza edilmesi, petrilerin analiz tamamlanmadan ara değerlendirme için sayımı) [1].

Diğer: Laboratuvar, sonuçlarını diğer laboratuvar sonuçları ile karşılaştırmak için yeterlilik testlerine katılmalıdır [1].

Laboratuvara rutin gelen numuneler dışında bir numune geldiğinde, matriks farklı ise bu matriksle basit bir doğrulama yapması gerekebilir. Bu amaçla, numunenin ilk zenginleştirmesine referans materyal ile 2-3 seviyede mikroorganizma ilavesi yapılarak çift paralel çalışılabilir [1].

13.03.01.02. Kantitatif Metotlar

Kantitatif metotlarda kesinliğin ve gerçekliğin doğrulanması gerekir. Kesinliğin doğrulanması esnasında ölçüm belirsizliği de hesaplanır.

Kesinlik Çalışması

Kesinlik çalışması için ara kesinliğin standart sapması, aynı örneğin "tekrarüretilebilirlik koşulları" veya "tekrarüretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik koşulları" altında tekrarlanması ile elde edilir [1].

Tercihen doğal kontamine numune, ancak bulunamıyorsa inoküle edilmiş numune kullanılabilir. İnokülasyon, test porsiyonuna veya ilk seyreltmeye yapılabilir. Hangi adımda numuneye inokülasyon yapıldığı ölçüm belirsizliği hesaplanırken dikkate alınmalıdır. Laboratuvar ilgili matrikslerde en az bir temsili numunede çalışma yapmalıdır [1].

NMKL No 32 içerisinde ara kesinliğin hesaplanması, NMKL No 8 ve ISO/TS 19036 olarak iki farklı yaklaşım ile anlatılmaktadır. NMKL yaklaşımında tekrarlanabilirlik çalışmasından gelen değişkenlik de hesaplamaya katılmaktadır. Bu nedenle ISO yaklaşımından daha yüksek bir standart sapma elde edilmektedir. Bununla birlikte ISO yaklaşımı aynı gıda grubu içinde değişik numunelerde çalışmayı sağlamakta ve tekrarüretilebilirlik koşullarında iki paralel olarak çalışılmaktadır. Bu nedenle yaklaşımlar direkt olarak karşılaştırılmamalıdır [1], [12], [13]. Aşağıda iki yaklaşım ile aynı değerlerin hesaplamaları sunulmuştur.

NMKL yaklaşımına göre, ara kesinlik laboratuvar içi tekrarlanabilirlik ve seriler arası değişkenliğin toplamından oluşur. Önerilen, her bir analistin temsili matriks gruplarında 10'ar tekrar yapmasıdır. Analistler değişik parti kimyasallar ile değişik günlerde çalışma yapmalıdır. Eğer çalışan tek bir analist varsa 10 paralel çalışmayı farklı günlerde tekrarlayabilir. İki farklı analist (A ve B) tarafından farklı günlerde yapılan 10 ölçüm üzerinden yapılan hesaplama Çizelge 13.13'de belirtilmiştir.

Çizelge 13.13. Farklı iki gün, farklı 2 analist (A ve B) ve 10 paralel ölçümün sonuçları (örnek)

Tekrarlar, n	A (Gün 1)	B (Gün 2)
1	3,67	3,50
2	3,66	3,66
3	3,72	3,50
4	3,85	3,70
5	3,70	3,40
6	4,02	3,80
7	3,87	3,65
8	3,90	3,50
9	3,74	3,48
10	3,45	3,50
Ortalama, x_{ort} $\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$ (38)	3,76	3,57
Standart sapma, sd $sd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ (40)	0,16	0,13
A ve B standart sapmasının kombinasyonu, s_r $s_r = \sqrt{\frac{sr_1^2 + sr_2^2}{2}}$ (50)	0,143	
A ve B'nin ortalaması, y	3,66	
A ve B'nin ortalamasının standart sapması, s_x $s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}(x_i - y)^2}{n-1}}$ (51)	0,13	
s_L^2 $s_L^2 = s_{\bar{x}}^2 - \frac{s_r^2}{n}$ (52)	0,0158	
s_{iR} $s_{iR} = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}$ (53)	0,19	

Aynı veriler kullanılarak A ve B analisti tarafından farklı günlere ait ölçüm sonuçları ISO/TS 19036 şablonuna göre hesaplanmıştır (Çizelge 13.14).

Çizelge 13.14. Ara kesinlik koşullarında iki paralel 10 numunenin ölçüm sonuçları (örnek)

Tekrarlar, n	A	B	a-b	$(a-b)^2$
Gün 1	3,67	3,50	0,17	0,03
Gün 2	3,66	3,66	0,00	0,00
Gün 3	3,72	3,50	0,22	0,05
Gün 4	3,85	3,70	0,15	0,02
Gün 5	3,70	3,40	0,30	0,09
Gün 6	4,02	3,80	0,22	0,05
Gün 7	3,87	3,65	0,22	0,05
Gün 8	3,90	3,50	0,40	0,16
Gün 9	3,74	3,48	0,26	0,07
Gün 10	3,45	3,50	-0,05	0,00
Toplam				0,52
$s_{IR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(a_i - b_i)^2}{2n}}$ (54)				0,16

NMKL prosedürü, ISO/TS 19036'ya göre yapılan hesaplamanın kendi belirttiği yöntemine göre tüm değişkenlerin değerlendirmeye alınmaması nedeniyle daha düşük sonuç elde edilmesine neden olduğunu belirtmektedir. Ancak yapılan karşılaştırma aynı seviyedeki numuneler ve tekrarlanabilirlik verileri kullanarak yapılmış ve yorumlanmıştır.

Laboratuvarların ara kesinlik yaklaşımını dikkate alırken güncel hayatta karşılaştığı değişkenliği yaratması çok önemlidir. ISO/TS 19036'da belirtilen A ve B ölçüm koşulu, farklı analistleri, farklı parti besiyerinin kullanımını, farklı parti kimyasalları, test porsiyonlarına farklı suşların inokülasyonunu, farklı inkübatörlerde inkübasyonun yapılmasını ve farklı hacim ölçerler gibi analizin her basamağında olması muhtemel değişkenliğin sağlanmasını kapsamaktadır. Bu yaklaşımda aynı zamanda 10 adet karşılaştırmanın aynı numune olması gerekli değildir. Bu bağlamda eğer yeterli değişkenlik sağlanırsa NMKL prosedüründe belirtilen değerlendirmenin oluşması beklenmez; zira ara kesinlik koşulları yeterli değişkenliği sağlamaktadır.

Belirsizlik hesabı yapılırken mikroorganizmaların matriks içindeki dağılımı, petrideki düşük sayım gibi ek varyasyon kaynakları mutlaka değerlendirmeye alınmalıdır.

Kabul kriteri

Hesaplanan ara kesinlik standart sapması aynı kategori ve numune tiplerindeki geçerli kılma verilerindeki kolaboratif çalışmada elde edilen standart sapmadan daha düşük olmalıdır. Eğer hedef standart sapma kolaboratif çalışmadan elde edilmemişse NMKL No 8'de ara kesinlik standart sapmasının 0,4 Log_{10} kob/g'ı geçmemesi önerilmektedir.

Gerçeklik

Gerçeklik, geniş bir sonuç serisinden elde edilen ortalama değer ile kabul edilen bir referans değer arasındaki yakınlığı ifade eder ve dört farklı şekilde hesaplanabilir [1]. Bunlar;

a) yeterlilik testi gibi laboratuvarlar arası karşılaştırma testlerine katılım ve z-skoru ya da zeta skoru ile eğilimin görülmesi,
b) referans materyal veya sertifikalı referans materyallerin kullanımı,
c) inoküle edilmiş bir numune ile geri kazanım çalışması (referans değerin belirlenmesi için seçici olmayan bir metot kullanılır),
d) referans metot ile karşılaştırma çalışmasının yapılması.

NMKL No 32'de yeterli sayıda verinin bulunması durumunda bu yöntemler arasında sapmanın hesaplanmasındaki en hassas yöntemin yeterlilik testleri üzerinden yapılan hesaplama olduğunu belirtilmektedir. İnokülasyon yapılarak veya referans metot ile yapılan karşılaştırma ise laboratuvarda analiz edilen değişik matrikslerin incelenebilmesi yönünden avantajlı olarak gözükmektedir [1].

Örneğin; *Campylobacter* yeterlilik testinde laboratuvarlara 10'ar numune gönderilmiştir. Katılımcı laboratuvar sayısı 36 (n=36) ve uygulanan metodun standart belirsizliği 0,15 Log_{10} kob/g'dır. Buna göre numunelerdeki sapma aşağıdaki zeta skoru formülüne göre hesaplanabilir [1].

$$Zeta\ skoru\ \zeta = \left(\frac{X_{lab} - X_{PTort}}{\sqrt{u_{lab}^2 + \left(\frac{s_{PT}}{\sqrt{n}}\right)^2}} \right) \quad (55)$$

X_{lab} = Laboratuvara ait sonuç, Log_{10} kob/g

X_{PTort} = Yeterlilik testinde atanmış değer, Log_{10} kob/g

u_{lab} = Test metodunun standart belirsizliği (genişletilmiş değil)

s_{PT} = Yeterlilik testinin standart sapması,

n = Yeterlilik testine katılan katılımcı sayısı

Zeta skorunun -2 ve +2 değerleri arasında olması beklenir, üzerinde ve altında olan değerler sistematik bir hata olduğunun göstergesidir [1].

Eğer uygun bir yeterlilik testi veya referans materyal bulunamıyorsa laboratuvar verifikasyon çalışmalarında laboratuvarlar arası karşılaştırma testini kendisi düzenleyebilir. Örneğin, homojen hale getirilen 5 ayrı numune, 2-3 farklı laboratuvara gönderilir. Her laboratuvar bu beşer örneği aynı günde analiz etmelidir. Numunelerin taşıma esnasında etkilenmemesi sağlanmalıdır [1].

Çizelge 13.15. Sapmanın yeterlilik sonuçları üzerinden hesaplanması için örnek çalışma [1]

Örnek	Laboratuvar sonucu x_{lab} Log_{10} kob/g	Yeterlilik ortalaması x_{PTort} Log_{10} kob/g	Yeterlilik standart sapması s_{PT} Log_{10} kob/g	zeta skoru
1	4,38	4,41	0,61	-0,17
2	3,32	3,29	0,42	0,18
3	3,54	3,73	0,7	-1,00
4	3,21	3,00	0,33	1,31
5	0,00	<1		
6	4,75	4,48	0,66	1,45
7	0,00	<1		
8	3,18	3,31	0,59	-0,72
9	3,48	3,13	0,55	1,99
10	3,13	2,99	0,55	0,80

İnokülasyon yapılarak zenginleştirilmiş numunelerin sonuçları üzerinden de gerçeklik hesaplanabilir. Minimum çalışılması gereken kategori sayısı ve temsili numune miktarı Çizelge 13.16 ve Çizelge 13.17'de belirtilmiştir. Her bir temsili numunede en az iki seviyede çalışma yapılmalıdır.

Çizelge 13.16. Doğrulama kapsamına uygun olarak zenginleştirme ile yapılan gerçeklik çalışması için gerekli minimum numune miktarı [1]

Doğrulama kapsamı (matriks grupları sayısı)	Analiz edilmesi gereken matriks grupları sayısı	Her bir matriks grubunda değişik kategorileri temsil edecek temsili ürün sayısı	Her bir temsili ürün için inoküle numune sayısı (iki inokülasyon seviyesi ve her birinde iki paralel çalışma)	İnoküle edilmeyen temsili numune sayısı	Toplam numune sayısı
1	1	2	4	2	12
2	2	2	4	2	24
n (n=1-9)	n	2	4	2	n x 12

İnokülasyon ile zenginleştirmenin alternatif yöntemi ise akredite referans bir metot ile karşılaştırmadır. Numuneler çift olarak analiz edilir. Amaca uygun bir karşılaştırma olabilmesi için seviyelerin her iki metodun da tayin sınırı içinde olması gerekir. Kabul kriteri inokülasyon yöntemi ile aynıdır [1].

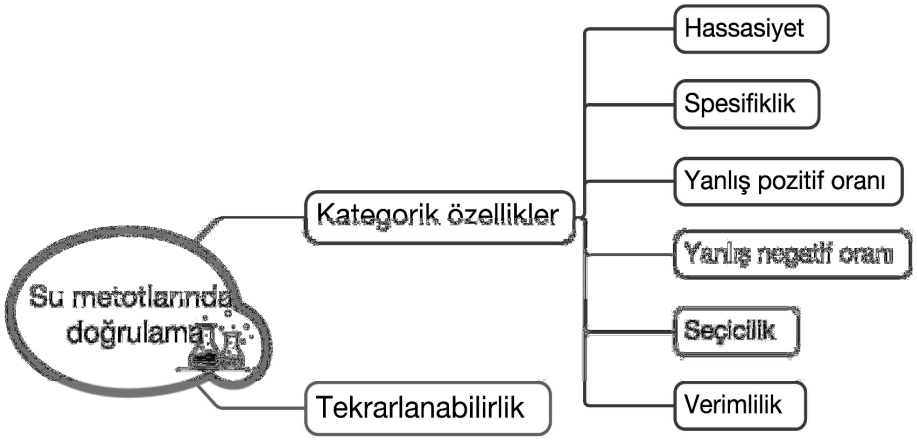
Elde edilen sonuçların karşılaştırılması için, elde edilen ve eklenen koloni sayıları (absolut değer kob olarak) arasındaki oranın 2'den fazla olmaması istenir. Örneğin 48 kob *E. coli*/g eklenmiş ise elde edilenin 25-95 kob/g olması beklenir. Bu da yaklaşık olarak +/- 0,3 Log_{10} değeridir [1]. ISO 16140 standardı farkın maksimum 0,5 log kob/g olmasını beklemektedir.

Çizelge 13.17. Doğrulama kapsamına uygun olarak akredite referans metot karşılaştırması ile yapılan gerçeklik çalışması için gerekli minimum numune miktarı [1]

Doğrulama kapsamı (matriks grupları sayısı)	Analiz edilmesi gereken matriks grupları sayısı	Her bir matriks grubunda değişik kategorileri temsil edecek temsili ürün sayısı	Her bir temsili üründeki numune sayısı	Toplam numune sayısı (referans metot + doğrulanan metot)
1	1	2	4	16 (8 referans metot + 8 doğrulanan metot)
2	2	2	4	32
n (n=1-9)	n	2	4	n x 16

13.03.02. Su Numunelerinde Mikrobiyolojik Analizlerde Doğrulama

Sularda yapılan mikrobiyolojik analiz metotlarının verifikasyonunda bakılması gereken parametreler ISO 13843 standardında tanımlanmıştır [3].



Şekil 13.09. Su metotları için doğrulama parametreleri

13.03.02.01. Hassasiyet, Spesifiklik, Verimlilik, Seçicilik, Yanlış Pozitif Oranı, Yanlış Negatif Oranı

Kategorik performans özelliklerinin doğrulamasında her bir kategori için minimum 5 numune analiz edilir. Çalışma için 100 ml'sinde 20-80 koloni bulunan numuneler hazırlanır. İçme suyunu kirletmek için numune olarak yüzey suyu ya da kirli su kullanılabilir. Kirletmek için kullanılan yüzey suyu ya da kirli su en az iki kaynaktan sağlanmalıdır [3].

Mümkünse doğal kontamine numuneler tercih edilir. Numuneler daha sonra normal analiz prosedürüne göre incelenir [3].

İnkübasyon sonrasındaki tüm koloniler 13.02.02.01 Kategorik Performans Özellikleri bölümünde tariflendiği şekilde doğrulanır. Koloniler daha sonra doğru veya yanlış pozitif ve doğru veya yanlış negatif olarak kaydedilir. EMS metotlarında aynı yaklaşım uygulanabilir. "Koloni" terimi burada "temsili alınan miktar", "tipik" terimi "pozitif", "atipik" terimi "negatif" olarak değiştirilebilir.

a) Hedef mikroorganizma olarak doğrulanan koloni sayısı (doğru pozitif)
b) Hedef mikroorganizma olarak doğrulanan atipik koloniler (yanlış negatif)
c) Hedef mikroorganizma olmadığı doğrulanan tipik koloniler (yanlış pozitif)
d) Hedef mikroorganizma olmadığı doğrulanan atipik koloniler (doğru negatif)

Bu olasılıklar 2X2 çapraz tablosu olarak aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir;

Çizelge 13.18. 2X2 çapraz tablo ile kategori karşılaştırma

		Varsayılan koloniler		
		Pozitif	Negatif	
Doğrulanmış kolonilerin sonuçları	Pozitif	a	b	a+b
	Negatif	c	d	c+d
		a+c	b+d	n

Toplam test edilen numune sayısı = a+b+c+d=n (24)

Hassasiyet = a/(a+b) (25)

Spesifiklik = d/(c+d) (26)

Yanlış pozitif oranı = c/(a+c) (27)

Yanlış negatif oranı = b/(b+d) (28)

Seçicilik = a/n (29)

Verimlilik = (a+d)/n (30)

Örnek çalışma ISO 13843 standardında geçerli kılma bölümüne verilen örnekten modifiye edilerek hazırlanmıştır.

Standart bir metot olan ISO 9308-1 metot prensibi kromojenik besiyeri kullanılarak koliform bakteri ve *E. coli*'nin kendi içinde ve diğer mikroorganizmalardan renk ayrımı ile koloni sayımına dayanmaktadır, ayrıca metot akışında oksidaz testi ile doğrulama basamağı bulunmaktadır. Ancak duyarlılık, özgüllük, yanlış pozitif oran ve yanlış negatif oranı belirlenirken, İkinci doğrulama amacıyla biyokimyasal analizler içeren ticari kit kullanılmıştır.

Doğrulama çalışması için sonuçları 20-80 kob olan 5 numune analiz edilmiş ve tüm bulunan koloniler doğrulanarak Çizelge 13.19'a işlenmiştir. Örnek çalışmada 90 adet mavi-menekşe koloniden biyokimyasal doğrulama sonrasında 79 adet E. coli tespit edilmiştir. Toplam 180 pembe/kırmızı koloniden doğrulama sonucunda 16 koloni *E. coli* tespit edilmiştir. Toplam 90 adet renksiz koloniden doğrulama sonucunda *E. coli* tespit edilmemiştir.

Çizelge 13.19. Örnek çalışma verilerinin 2X2 diyagramına yerleştirilmesi

Numune	a	b	c	d	Toplam koloni sayısı
1	20	3	1	52	76
2	15	2	1	51	69
3	13	2	0	55	70
4	17	2	1	54	74
5	21	0	1	49	71
Toplam	86	9	4	261	360

Doğrulanmış kolonilerin sonuçları

	Varsayılan koloniler: Pozitif	Negatif	
Pozitif	a=86	b=9	a+b=95
Negatif	c=4	d=261	c+d=265
	a+c =90	b+d=270	n=360

a= Hedef mikroorganizma olarak doğrulanan koloni sayısı (doğru pozitif)= 86

b= Hedef mikroorganizma olarak doğrulanan atipik koloniler (yanlış negatif)= 9

c= Hedef mikroorganizma olmadığı doğrulanan tipik koloniler (yanlış pozitif)= 4

d= Hedef mikroorganizma olmadığı doğrulanan atipik koloniler (doğru negatif) = 261

Toplam test edilen numune sayısı = a+b+c+d = n = 360

Hassasiyet (sensitivity) = a/(a+b) = 0,905 (%90,5)

Spesifiklik (specificity) = d/(c+d) = 0,985 (% 98,5)

Yanlış pozitif oranı = c/(a+c) = 0,044 (%4,4)

Yanlış negatif oranı = b/(b+d) = 0,033 (%3,3)

Seçicilik (selectivity) = a/n = 0,239 (%23,9)

Verimlilik (efficiency) = (a+d)/n = 0,9139 (%91,39)

13.03.02.02. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışması için aynı numune ile tekrarlanabilirlik koşullarında (aynı analist**,** aynı gün, aynı zaman aralığında ve numuneler aynı inkübatöre konularak) 10 tekrar yapılır. Tekrarlar değişik kaynak ve seviyelerde en az üç set halinde yapılmalıdır. Doğal kontamine numuneler tercih edilmelidir. Analiz sonuçlarına dağılımın Poisson indeksi uygulanarak yüksek dağılım varlığı Formül 41 kullanılarak kontrol edilir [3].

$$\chi^2_{r-1} = \frac{r\sum x_i^2}{\sum x_i} - \sum x_i \qquad (41)$$

r; paralel sonuçların sayısı

x_i; i inci gözlenen koloni sayısı (i=1 ….. r)

Dağılımın Poisson indeksi teorik olarak chi-square dağılım ile takip edilmektedir. Elde edilen χ^2_{r-1} değeri r-1 serbestlik kat sayısındaki (10 tekrar için r-1=9) tek yönlü χ^2 değeri ile karşılaştırılır.

Çizelge 13.20. Tekrarlanabilirlik çalışmasında veri setlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi [3]

Durum	Teorik limitle karşılaştırma	Sonuç
1	Gözlenen $\chi^2_{r-1} < \chi^2_{r-1;0,95}$	Hesaplanan değer %5 limit değerinin altında ise Poisson dağılımından anlamlı bir fark yoktur.
2	$\chi^2_{r-1;0,95} <$ Gözlenen $\chi^2_{r-1} < \chi^2_{r-1;0,99}$	Hesaplanan değer %5 limit değerinin üstünde ancak %1 limit değerinin altında ise dağılım Poisson dağılımından anlamlı olarak büyüktür.
3	$\chi^2_{r-1;0,99} <$ Gözlenen χ^2_{r-1}	Hesaplanan değer %1 limit değerinin üzerinde ise dağılım Poisson dağılımından yüksek anlamlı olarak büyüktür.

Durum 2 veya 3'ün olması halinde, bağıl operasyonel varyans u_0^2 Anscombe'nin ilk metoduna göre hesaplanır [3].

$$u_0^2 = \frac{s^2 - \bar{x}}{\bar{x}^2} \quad (42)$$

s^2; paralel sonuçların varyansı

$\bar{x}$; paralel sonuçların aritmetik ortalaması

Yukarıda tabloda verilen ilk durumda u_0^2 0'dan anlamlı bir şekilde farklı olmayacaktır. Doğru bir değerlendirme yapılabilmesi için optimum sayıda mikroorganizma bulunmalıdır. Ortalamanın 20'den daha düşük olmaması gerekir. Değişik setlerde tekrarlanabilirlik çalışması yapıldığında bağıl operasyonel varyans her bir setin bağıl operasyonel varyanslarının aritmetik ortalamasından hesaplanmalıdır [3].

Sonuçta tekrarlanabilirlik % olarak aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

$$u_0 = \sqrt{u_0^2} \times 100 \quad (56)$$

Çizelge 13.21. Tekrarlanabilirlik çalışması verileri ve hesaplama örneği (ISO 13843'de anlatılan örneğin formülasyonlu halidir)

Tekrar	1. numune	2. numune	3. numune
n1	63	47	21
n2	65	60	16
n3	77	40	20
n4	59	57	24
n5	69	24	21
n6	61	39	34
n7	55	57	23
n8	65	52	26
n9	33	35	18
n10	90	54	14
Gözlenen değer, χ^2_{r-1}	30,5824	26,3763	13,1843
Aritmetik ortalama, $\bar{x}$	63,7	46,5	21,7
Varyans, s^2	216,4556	136,2778	31,7889
Bağıl operasyonel varyans, u_0^2	0,03764594	0,041520535	0,02142515
Limit, $\chi^2_{r-1,0.95}$	16,919	=CHIINV(0,05;9)	
Limit	21,666	=CHIINV(0,01;9)	
Değerlendirme	$\chi^2_{r-1} > \chi^2_{r-1.0.95}$	$\chi^2_{r-1} > \chi^2_{r-1.0.95}$	$\chi^2_{r-1} < \chi^2_{r-1.0.95}$
	Yüksek	Yüksek	Düşük
Bağıl operasyonel varyansların Aritmetik ortalaması	0,0335	=AVERAGE(B15:D15)	
Tekrarlanabilirlik %	18,3		

13.04. Numunelere Mikroorganizma İnokülasyon Yöntemleri

13.04.01. Karışımla Kirletme

Doğal kontamine numunelerin x gramı, kirletilmemiş numunenin y gramı ile karıştırılarak istenen kontaminasyon seviyesine ulaşılır. Karışımla kirlenmiş numune, o gıda maddesi için uygun saklama sıcaklığında analizden önce en az 1 gün boyunca saklanır ve mikrobiyel yükün gıda maddesinde dengeye gelmesi sağlanır [14].

13.04.02. Ekim-Üretme Prosedürü

Doğal numunelerin seyreltilmiş bir kültürle kontamine edilmesi ve mikroorganizmanın gıdadaki çevresel koşullara adaptasyonu için numunenin uzun bir süre depolanması prensibine dayanır. İşlem gıdanın yüksek veya düşük nem seviyesine göre uygulanır [14].

Yüksek Nemli Gıdaların Yapay Kontaminasyonu

-Hedeflenen mikroorganizma kültürü elde etmek için kullanılan suş, seçici olmayan sıvı zenginleştirme besiyerine inoküle edilir ve optimal koşullar dikkate alınarak inkübasyona bırakılır. Besiyerinde üreyen suş miktarı tespit edilir.

-İnkübasyondan sonra uygun bir seyreltici ile hedeflenen düzeye ulaşmak için seyreltmeler yapılır. Çalışmada hedeflenen seyreltme seviyesi, inoküle edilecek gıdaya, kullanılacak suşun kontaminasyon seviyesine, beklenen mikroflora seviyesine ve gıdanın saklama koşullarına bağlıdır.

-Üretimi prosesinde ısıl işlem gören gıdaları kirletmek için kullanılan suşlar, ısı stresi oluşturmak için sıcaklığa maruz bırakılmalıdır. Örneğin kirletme işleminden önce 50°C'ta 15 dk.

-Bilinen hacimdeki suş gıdaya pipetlenerek/ püskürtülerek inoküle edilir. İnokülasyon, numunelerin tümüne karıştırılarak homojenize edilebileceği gibi, ayrı ayrı da yapılabilir. Gıdanın su aktivitesinin etkilenmemesi için inokülum hacminin mümkün olduğunca düşük olması gerekir. Genellikle 25 g numune başına 0,25 ml uygulanması önerilir (%1).

-Homojenliği sağlamak için numune iyice karıştırılır.

-Numunenin kararlılığını/stresini sağlamak için numune normal depolama sıcaklığında muhafaza edilir. Mikroorganizmaların potansiyel gelişimi ve yaşaması için depolama süresi ve sıcaklığı dikkate alınmalıdır. Buna göre numuneler aşağıda belirtilmiştir:

-Dondurulmuş gıdalar (örneğin dondurma): -20 ºC'de en az 2 hafta,

-Buzdolabında (örneğin portakal suyu): 2-8 ºC'de en az 48 saat,

-Oda sıcaklığında (örneğin fındık): 20-25 ºC'de en az 2 hafta

-İstenilen kontaminasyona ulaşıldığından emin olmak için numunelerin kontaminasyon seviyesinin kontrolü yapılmalıdır [14].

Düşük Nemli Gıdaların Yapay Kontaminasyonu

-Düşük nemli gıdaların yapay kontaminasyonu için liyofilize edilmiş kültür kullanılır. Liyofilize edilmiş kültürün hazırlanması için belirlenen suş, seçici olmayan zenginleştirme besiyerinde optimal koşullarda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında, santrifüj ile hücreler toplanır. Steril tamponlu su ile iki kez yıkanır. Santrifüj işlemi tekrarlanır, süpernatant boşaltılıp alttaki kısım steril

%10 yağsız kuru süt ile tekrar süspansiyon haline getirilir. Bu süspansiyona liyofilizasyon işlemi uygulanır.

-Liyofilizasyon işleminden sonra homojen ince bir toz oluşturmak için liyofilize edilmiş kültür ezilir. Kontaminasyon seviyesini belirlemek için seçici olmayan bir besiyerinde ve optimal koşullarda inkübe edilir.

-0,1 g hazırlanan liyofilize kültür ile 10 g'lık temiz gıda, steril bir kap içinde (örneğin plastik torba) karıştırılır. Karışımın homojen olmasına önem verilir ve bu karışımdan 10 katlı seyreltmeler yapılır.

-Kirletilen gıda, o gıdaya uygun depolama sıcaklığında (tercihen normal saklama sıcaklığında) muhafaza edilir. Herhangi bir analizden önce mikrobiyel popülasyonun en az iki hafta boyunca gıdada dengeye gelmesine izin verilmelidir.

-Uygun bir süre saklandıktan sonra inokülasyon seviyesinin kontrolü yapılabilir [14].

13.04.03. Kirletme Prosedürü

Seyreltilmiş kültüre stres koşulları uygulandıktan sonra stresli kültürün analiz edilecek örneğe eklenmesi prensibine dayanır.

-Kontamine edilecek suş seçici olmayan sıvı zenginleştirme besiyerine (örneğin Tryptone Soy Broth'a) inoküle edilir. Suş için optimal koşullar dikkate alınarak bir gece inkübasyona bırakılır.

-İnkübasyon sonrası üreyen suş miktarının tespit edilmesi için on katlı seyreltmeler hazırlanır (örneğin 10^{-7} ve 10^{-8}). Yayma yöntemi ile 10^{-7} ve 10^{-8} tüplerden 0,1 ml seyreltme sıvısı iki ya da üç petri olarak Tryptic Soy Agar besiyeri yüzeyine yayılır. Petriler 24 saat 37°C'de veya mikroorganizmaya uygun koşullarda inkübe edilir. Her bir petrideki koloni sayılır ve bu veriler üzerinden ortalama mikroorganizma yükü belirlenir ve buradan 10^4 -10^5 kob/ml seviyesine seyreltim yapılır.

-Mikroorganizmalara stres uygulamak için kirletme yapılacak örneğe uyumlu olacak şekilde aşağıdaki işlemlerden uygun olanı seçilir:

-Belirli bir sıcaklıkta su banyosunda bekletilerek ısıl işlem (örneğin 50°C'de 15 dk),

-Dondurma işlemi (örneğin -20°C'de 72 saat),

-Kimyasal işlem (örneğin yüksek tuz konsantrasyonunda veya düşük pH'da işlem),

-4°C'de saklama (örneğin en az bir hafta boyunca)

-Uygulanan stres ile mikroorganizmalardaki hasar seçici ve seçici olmayan besiyerinde sayım yapılarak değerlendirilir. Yeterli stres uygulandığında 0,5 Log_{10} kob/ml'den fazla fark beklenir.

-Kirletme için kültür istenilen seviyede seyreltilir. Kalitatif yöntemler için bu seviye, metodun en düşük LOD seviyesi olmalıdır. Bilinen hacimdeki suş gıdaya pipetlenerek/püskürtülerek inoküle edilir. İnokülasyon, numunelerin tümüne karıştırılarak homojenize edilebileceği gibi, ayrı ayrı da yapılabilir. Belirli miktarda suş numunenin tümüne birden ya da numunelere tek tek inoküle edilebilir. İnokülum hacmi, su aktivitesini önemli ölçüde etkilememesi için mümkün olduğunca düşük olmalıdır. Genel olarak 25 g numune başına 0,25 ml kullanılır. Homojenliği sağlamak için numune iyice karıştırılır [14].

13.05. Geçerli Kılma ve Doğrulama Çalışmalarında Kullanılan Gıda Kategori ve Ürünleri [1]

Matriks Grubu	Kategori	Temsili Ürünler (Numuneler)
Süt & Süt Ürünleri	Çiğ süt ve süt ürünleri	Çiğ süt Çiğ süt peynirleri
	Isıl işlem görmüş süt ve süt ürünleri	Süt bazlı tatlılar, dondurmalar, içecekler, kaymaklar UHT sütler, konserve sütler veya kaymaklar Fermente/asitlendirilmiş pastörize süt, yoğurt, süt bazlı ürünler Pastörize sütler Tereyağları Kaymaklar Sert ve yarı sert peynirler (ısıl işlem görmüş) Yumuşak peynirler Süt tozları Süt bazlı tatlı tozları
Et	Kırmızı et ve et ürünleri (çiğ)	Karkaslar, kesilmiş etler Kıyma, hazırlanmış etler, Karkaslar, swaplar, Dondurulmuş burger köftesi, marine edilmiş dana şiş/kebap
	Kırmızı et ve et ürünleri (işlenmiş)	Pişmiş jambon Salam Kuru kürlenmiş jambon Konserve sığır eti
	Beyaz et ve et ürünleri (çiğ)	Karkaslar, kesilmiş etler Karkaslar, swaplar, Kıyma, hazırlanmış etler Terbiyeli tavuk göğüs eti

Matriks Grubu	Kategori	Temsili Ürünler (Numuneler)
Et (devam)	Beyaz et ve et ürünleri (işlenmiş)	Pişmiş hindi filetosu Tavuk sosisi Füme hindi filetosu Konserve kanatlı eti, konserve ördek beyni
Yumurta	Yumurta ve yumurta ürünleri (çiğ)	Kabuklu yumurta
	Yumurta ve yumurta ürünleri (işlenmiş)	Yumurta sarısı, yumurta akı, sıvı yumurta Yumurta tozu
Balık & Deniz Ürünleri	Çiğ balık ve kabuklu deniz ürünleri (işlenmemiş)	Balık İstiridye, deniz tarağı, midye Karides, yengeç ve yengeç eti, ıstakoz Dondurulmuş balık kroketleri
	Tüketime hazır balık ürünleri	Kabuklu ve kabuğu soyulmuş, pişmiş kabuklular, balık ve deniz ürünleri yahnileri Ringa balığı, hamsi Tütsülenmiş balık, kurutulmuş (tuzlanmış) balık Konserve balık, konserve yengeç
Bitkisel Ürünler	Taze ürünler ve meyveler	Meyve karışımları Paketlenmiş, önceden kesilmiş yapraklı sebzeler, salatalar, dilimlenmiş havuç Patates, tatlı patates, havuç, turpgiller Soya, çemenotu, yonca, maş fasulyesi Taze sıkılmış meyve suyu, sıvı meyve püresi Reyhan, kişniş, yeşil soğan, marul, maydanoz
	İşlenmiş meyveler ve sebzeler	Pastörize elma suyu Konserve ananas Dondurulmuş sebzeler Turşular
	Kurutulmuş tahıllar, meyveler, kuruyemişler, tohumlar, sebzeler	Şuruplar, konsantreler, reçeller Baharatlar, otlar, biberler Kuruyemişler, fındık içi, fındık ezmesi, tohumlar Dondurulmuş sebzeler Mısır, yulaf, kahvaltılık tahıllar

Matriks Grubu	Kategori	Temsili Ürünler (Numuneler)
Bitkisel Ürünler (devam)		Buğday, karabuğday, yulaf Önceden karıştırılmış, püskürtülerek kurutulmuş, kültür tozları (probiyotikler)
	Bebek formülleri ve bebek tahılları	Kurutulmuş süt, peyniraltı suyu bazlı kurutulmuş yoğurt (süt ürünü), soya bazlı (sebze) takviye formülasyonu (probiyotik veya probiyotik olmayan) Bebek tahılları Probiyotik bebek tahılları
	Çikolata, pastane ürünleri ve şekerlemeler	Kremalı unlu mamuller Şekerlemeler Kekler Krakerler, ekmekler, kurabiyeler Pasta, pralinler, badem ezmesi Bisküvi, çikolata, şekerleme, bal, şeker, şeker şurupları
Çok Bileşenli Gıdalar	Çok bileşenli gıdalar veya yemek bileşenleri	Sıcak yemekler Pişmiş soğutulmuş gıdalar, haşlanmış pirinç ya da makarna, Dondurulmuş patates kızartmaları, pizza, Kurutulmuş hazır çorbalar Soslu çiğ sebze salataları Sandviçler Ketçap, soslar, salata sosları, mayonezler, hardal
Yem	Hayvan / Evcil hayvan yemi	Et ve kemik unu, tavuk ve tüy unu, balık unu, Soya küspesi, sebzeler Maya özleri, probiyotikler gibi mikrobik ürünler Peletler, Taze et, sosis, kroket Konserve et, konserve balık Tahıllar, unlar
Çevresel Numuneler		Swaplar, tozlar (Geri dönüşümlü) yıkama suyu, proses suyu
Birincil Üretim Numuneler	Hayvan dışkıları	Swap numuneleri (çorap, çizme), rektal atıklar
	Çevresel numuneler ve dışkı olmayan ürünler	Toz numuneleri, hijyen swapları, otlardan ve kuluçkahaneden gelen su

BU BÖLÜME AİT KAYNAKLAR

1. NMKL No 32 Verification of microbiological methods. 2017.

2. *ISO 16140-2 Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.* 2016.

3. *ISO 13843 Water quality - Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods.* 2017.

4. Jarvis, B., Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods. 2015.

5. ISO 16140-1 Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 1: Vocabulary. 2016.

6. Wilrich, P.T. Forschungsschwerpunkt Statistik Und Ökonometrie. Available from: http://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich.

7. ISO 11133 Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 2014.

8. ISO 29201 Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods. 2012.

9. ISO 7704 Water quality -- Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses. 1985

10. ISO 17994 Water quality -- Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods. 2014.

11. *NMKL No 20 evaluation of results from qualitative methods* 2007.

12. *NMKL No 8 Measurement of uncertainty in quantitative microbiological examination of foods 2008.*

13. *ISO/TS 19036:2006+A1:2009 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.* 2009.

14. *ISO 16140-2 Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. 2016.*

Hatırlatma:

Uluslararası ve ulusal standartlar sürekli olarak güncellenmektedir. Okuyucu, güncel standartlardaki güncellemeleri sürekli olarak ilgili kaynaklardan izlemelidir.

Hatırlatma:

Elektronik ortamda çok ciddi boyutlarda bilgi kirliliği vardır. Okuyucu, özellikle güncellenen standartlar konusunda uluslararası kuruluşların web sitelerini izlemelidir.

14. MİKROORGANİZMA ANALİZLERİ

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

14.01. Genel Bilgiler **502**
14.02. Toplam Aerobik Koloni **503**
14.03. Anaerop Bakteriler **505**
14.04. Maya ve Küfler **507**
14.05. Toplam *Enterobacteriaceae* **509**
14.06. Koliform grup bakteriler **510**
14.06.01. Koliformlar; Katı Besiyeri Kullanımı 511
14.06.02. Koliformlar; EMS Yöntemi 512
14.06.03. Koliformlar; Membran Filtrasyon 512
14.06.04. Koliformlar; Var/yok Analizi 513
14.06.05. Koliformlar; Yüzey Analizleri 513
14.07. Fekal Koliformlar **513**
14.08. *E. coli* (biyotip 1) **514**
14.08.01. *E. coli*; Katı Besiyeri Kullanımı 516
14.08.02. *E. coli*; EMS Yöntemi 517
14.08.03. *E. coli*; Membran Filtrasyon 518
14.08.04. *E. coli*; Var/yok Analizi 518
14.09. *E. coli* O157 serotipi **519**
14.09.01. *E. coli* O157 Standart Analizi 519
14.09.02. *E. coli* O157 Hızlı Analizi 519
14.09.03. Verotoksin Analizi 520
14.10. *Salmonella* spp. **520**
14.10.01. *Salmonella*; Var/yok analizi 520
14.10.02. *Salmonella* Hızlı Analizi 521
14.10.03. Biyokimyasal ve Serolojik Testlerle *Salmonella* Doğrulanması 522
14.11. *Clostridium botulinum* **523**
14.12. *Clostridium perfringens* ve Sülfit İndirgeyen Anaeroplar **523**
14.12.01. *Cl. perfringens* 523
14.12.02. Sülfit İndirgeyen Anaeroplar 524
14.13. *Listeria monocytogenes* **525**
14.13.01. *L. monocytogenes* Var/yok Analizi 526
14.13.02. *L. monocytogenes* Hızlı Analizi 527
14.13.03. *L. monocytogenes* Sayımı 528
14.14. *Staphylococcus aureus* **528**
14.14.01. *Staph. aureus*; Standart Analiz 528
14.14.02. *Staph. aureus*; Baird-Parker Rabbit Plasma Besiyeri 529
14.14.03. *Staph. aureus;* EMS Yöntemi 529
14.15. Campylobacter jejuni **530**
14.16. *Vibrio parahaemolyticus* **531**
14.17. *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii* **532**
14.18. *Bacillus cereus* **532**

14.18.01. *B. cereus*; Katı Besiyerinde Sayım 533
14.18.02. *B. cereus*; EMS Yöntemi ile Sayım 533
14.18.03. *B. cereus*; Var/yok Analizi 533
14.19. *Shigella* spp. **534**
14.20. *Yersinia enterocolitica* **534**
14.21. Enterokoklar **535**
14.21.01. Enterokoklar; Gıda Analizleri 535
14.21.02. Enterokoklar; Sularda Membran Filtrasyon Yöntemi 535
14.21.03. Enterokoklar; 100 mL Suda Var/yok Analizi 535
14.22. *Pseudomonas* spp. **536**
14.23. Sporlu Bakteriler **536**
14.24. Diğerleri **537**
14.24.01. Peynirde Geç Şişme Etmeni *Clostridium* spp. 537
14.24.02. Laktik Asit Bakterileri 537
14.24.03. *Alicyclobacillus* spp. 538
14.24.04. Asetik Asit Bakterileri 539
14.24.05. *Aeromonas* 539

14.01. Genel Bilgiler

Her şeyden önce bu bölümün ISO/ FDA gibi uluslararası standartların tam bir tercümesi olmadığı hatırlatılmaktadır. Yürürlükte olan ISO ve FDA standartlarının bu tarihteki güncellemelerine olabildiğince uyulmuştur. Uluslararası standartların sürekli güncelleştiği, okuyucu tarafından bilinmeli ve buna göre ISO/ FDA standartlarındaki güncellemeler izlenmelidir.

Gıdaların mikrobiyolojik analizi ile ilgili temel prensipler 07. bölümde verilmiştir. Amaca göre var/yok testleri yapılabilir ya da mikroorganizma sayılır. Var/yok testleri sadece patojenler için değil istenirse raf ömrü boyunca gıdanın stabilitesinin belirlenmesi açısından da saprofitler için uygulanabilir.

Patojenlerin standart analizinde 25 g(mL) numune kullanılsa da ticarette örneğin 100 g gıda numunesinde *Salmonella* bulunmaması istenebilir. İşletme, kendi iç kontrollerinde isterse 10 g gıda numunesinde *Listeria* analizi yapabilir, ancak her koşulda piyasaya verilen gıdanın 25 g(mL)'sinde *Listeria* olmamalıdır[1] ya da <100 KOB/g(mL) gibi düşük sayıda olmalıdır.

Gıda numunesinde mikroorganizma sayımı genel olarak saprofitlere uygulanmakla beraber bazı gıdalarda *L. monocytogenes*, *Staph. aureus* ve *Cl. perfringens* için <100 KOB/ g(mL) değerlere izin verilmektedir. Bu durumda aynı mikroorganizma için amaca (yasal standarda) göre var/yok testi uygulanabilir ya da sayım yapılabilir.

[1] AB ve başka ülkelerin standartlarında belirli sayılarda *L. monocytogenes* bulunmasına izin verilmektedir.

Var/yok analizlerinde ilgili standarda göre selektif olmayan ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine sürme aşamalarını içerebileceği gibi (*Salmonella*) yarı selektif besiyerinde ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine sürme aşamalarını (*Listeria*) ya da doğrudan selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine sürme aşamalarını (EHEC serotipleri) içerebilir. Laboratuvar sorumlusu gerek duyarsa örneğin EHEC serotipleri aranmasında ilave ön zenginleştirme yapabilir, ancak bu standart analiz sapması analiz raporunda belirtilmelidir. Patojenlerin ve saprofitlerin aranması ve sayılmasında standart analiz yöntemlerinden sapılması, araştırma amaçlı ya da ticarette özel talep olarak uygulanmaktadır.

Tüm mikrobiyolojik analizlerde uygulanacak yöntemler, standartlarda belirtilmiştir. Değişen sadece kullanılan besiyerleri ile inkübasyon koşullarıdır. Analiz standart şekilde başlar, ilgili besiyerlerine ekim yapılır, gerekirse bu kültürden başka besiyer(ler)ine geçilir. İnkübasyon parametrelerine (sıcaklık, süre ve inkübasyon atmosferi) tam olarak uyulmalıdır.

Uygulama öncesinde var/yok testleri, koloni sayımı, EMS ya da membran filtrasyon ile ilgili bölümler tam olarak okunmalıdır (bknz⇒ 07. ve 08. bölümler).

Bu bölümde adı geçen besiyerleri, çözeltiler ve diğer analiz gereçleri 15. bölümde verilmiştir. "Besiyerleri, Çözeltiler ve Diğer Gereçler" olan bu bölümde verilen sarf malzemesi bu bölümde italik olarak yazılmıştır.

Standart analizlerde kullanılan besiyerlerinde zaman içinde değişiklikler olmaktadır. Okuyucu, bu gibi değişiklikleri www.mikrobiyoloji.org ya da www.iso.org adreslerinden izlemelidir.

Analiz sonunda mikroorganizma gelişmesi olmayan besiyerleri dahil kullanılmış tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır ya da atılır (bknz⇒ 06. bölüm).

14.02. Toplam Aerobik Koloni

Toplam mezofil aerop bakteri kavramı 09.05. bölümde verilmiştir. Standart tanımıyla *plate count agar (PCA)* besiyerinde, aerobik ve mezofil inkübasyon koşullarında 72 saat sonunda oluşan tüm kolonilerin sayısı toplam aerobik koloni olarak ifade edilir.

Toplam aerobik koloni sayımında yayma kültürel ekim yöntemi kullanılması önerilir (bknz⇒ 07.06.01.01. bölüm). Bununla birlikte çeşitli ulusal ve uluslararası standartlarda toplam aerobik koloni sayımı için dökme kültürel sayım yöntemi de (bknz⇒ 07.06.01.02. bölüm) gösterilmektedir. Toplam aerobik koloni sayımında dökme kültürel sayım uygulamasından 2 nedenle sakınılmalıdır:

-40-45 ºC'ta yapılan dökme sırasında ısıya çok duyarlı bakteriler hasar görebilir. Bunun önüne geçmek için besiyeri 38-42 ºC'ta dökülebilir, ancak yoğun ekimlerde erlendeki agarlı besiyerinin jelleşme potansiyeli vardır.

-*Pseudomonas* spp. gibi zorunlu (obligat) aeroplar, Petri kutusunun tabana yakın kısmında kalırlarsa kolaylıkla koloni oluşturamayabilirler. Bunun önüne geçmek için agarlı besiyeri 10-12 mL gibi düşük hacimde dökülebilir.

Süt ürünlerinin analizinde çeşitli ulusal ve uluslararası standartlar besiyeri olarak *plate count agar+skim milk* besiyerini önermektedir.

ISO 4833-2:2013, toplam mezofilik aerobik analizinde 30 ºC'ta 72±3 saat süreyle aerobik inkübasyon önermektedir. Bu şekilde gıdanın genel mikrobiyolojik kalitesi hakkında bilgi edinilir. FDA ise inkübasyon parametrelerini 37 ºC'ta 24-48 saat olarak benimser. Bu şekilde gıdanın potansiyel tehlikesinin belirlenmesi amaçlanır. FDA, süt ürünlerinin analizinde inkübasyon sıcaklığı olarak 32±1 ºC'ı göstermektedir.

İçme ve kullanma sularının "toplam jerm" analizinde 1 mL su numunesi kullanıldığı için dökme plak yöntemi kullanılır. *Yeast extract agar acc. to ISO 6222* besiyeri kullanılır. İnkübasyon parametreleri, 37 ºC'ta 24 saat ve 22 ºC'ta 72 saat aerobik inkübasyon şeklindedir.

Psikrofil ve psikrotroflar ile termofil aeropların analizi aynı şekilde başlar, inkübasyon sıcaklığı ve süreleri farklıdır.

Düşük sıcaklık derecelerinde gelişen psikrofil ve psikrotrof bakterilerin sayımı ISO 17410:2001'e göre yapılır. Günlük ve standart uygulamada inkübasyon sıcaklığı 6,5 ºC ve süre 10 gündür. 4,5 ºC'ta 14 günlük inkübasyon da uygulanmaktadır. Bu nedenle inkübasyon parametreleri ilgili talimatlara ve analiz raporuna yazılmalıdır.

Termofil aeroplar için farklı standartlar, 50-55 ºC'ta 48-72 saat inkübasyon önermektedir. Çoğu literatür termofilik aeropları düz ekşime etmeni basiller olarak tanımlamakta ve farklı besiyerleri önermektedir. İnkübasyon parametreleri ilgili talimatlara ve analiz raporuna yazılmalıdır.

Termofil aeropların analizinde uygulanan 50-55 ºC'ta 48-72 saat inkübasyon sırasında agarlı besiyerine kurumaya bağlı olarak gerçekte olandan daha az sayıda koloni elde edilmesi mümkündür. Bu olumsuzluk, besiyerinin ~20 mL dökülmesi ve/veya ekimi yapılmış Petri kutularının mutfak tipi streç filme sarılarak inkübasyona bırakılması ile önlenebilir.

Halofil karakterli olan ve gelişmeleri için mutlak olarak tuza gereksinim duyan bakteriler ile halotolerantların sayımında *plate count agar* besiyerine amaca uygun olarak %2-8 NaCl eklenir ve standart yöntemle sayım yapılır.

Aerobik koloni sayımı standart olarak koloni sayımı ile yapılır. Özel durumlarda ya da araştırmalarda istenirse diğer sayım yöntemleri de (EMS, membran filtrasyon vb.) kullanılabilir.

Standart Koloni Sayım Yönteminin Uygulanışı

Yöntemin uygulanışı şematik olarak Ek A01'de verilmiştir.

Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için süt ve ürünlerinde tercihen *¼ Ringer çözeltisi*, diğer gıdalarda *maximum recovery diluent (MRD)* kullanılır. Mayonez gibi yağlı ürünler için başka çözeltiler de kullanılır (⇒ bknz. 15.02 bölüm).

-Eğer analiz edilen numunede Petri kutusunun yüzeyini kaplayacak şekilde yayılma yapan bakteriler olduğundan kuşkulanılıyor ise ekimden sonra *PCA* üzerine 45 ºC'ta tutulan 4-5 mL *su agar* besiyeri dökülür ve bu uygulama analiz raporunda belirtilir.

-Gıdalarda toplam mezofil aerop bakteri sayımı sırasında gıda partikülleri ile bakteri kolonilerinin karışmasını önlemede en etkin yöntem, 45 ºC'a soğutulmuş 100 mL *plate count agar* besiyerine %0,5 derişimdeki *2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC)* çözeltisinden 1 mL eklemektir. *TTC* eklenen *PCA* besiyerinde koloniler kırmızı pigmentli olur ve kolaylıkla gıda partiküllerinden ayrılır. Bu yöntem, kırmızı partiküllü gıdalara uygulanamaz.

Hava ve Yüzey Analizleri

Mikroorganizmalar havada genellikle bakteri ve küf sporları olarak, ancak yüzeylerde tüm formlarda bulunabilirler. Dolayısıyla çalışma atmosferinde genellikle toplam bakteri ile maya-küf besiyerleri kullanılır. Hava ve yüzeylerin analizi 07.02.06. bölümde verilmiştir.

14.03. Anaerop Bakteriler

Anaeroplar hakkında 09.06. bölümde bilgi verilmiştir. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren anaeroplardan kasıt asıl olarak *Clostridium* türleridir. Bunun dışında başka anaerop ya da fakültatif anaerop bakteriler de gıdalarda bulunmakla birlikte analizlerde belirlenenler genellikle bu cins üyeleridir. Bir diğer deyiş ile anaerop bakteri analizleri, çok genel olarak *Clostridium* türlerinin saptanması üzerine kurulmuştur.

Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren *Clostridium* türleri içinde özel koşullarda geliştirilmesi gerekenler yoktur. Bu nedenle ekimi yapılmış tüplerin ve Petri kutularının basit olarak emzikli bir kavanoza yerleştirildikten sonra vakum pompası ile vakum uygulanması, normal bir kavanoza yerleştirildikten sonra kavanozda yanar bir mum bırakılarak kapağının kapatılması (mum kavanozu), tüplerin üzerine katı parafin ve Petri kutularının üzerine ikinci kat agarlı besiyeri dökülmesi gibi uygulamalar çoğu defa yeterli anaerop koşul sağlasa da standart analizlerde anaerop ortam sağlamak için geliştirilmiş özel sistemlerden (örneğin *Anaerocult*) yararlanılması gereklidir.

Amaca uygun olarak inkübasyon sıcaklığı seçilmelidir. Standart analizlerde kullanılan inkübasyon sıcaklığı 35-37 °C'tır. İnkübasyonda 28-30 °C ya da termofil anaeroplar için 55 °C kullanılır. Uygulanan inkübasyon sıcaklığı analiz raporunda belirtilmelidir.

Sadece sporlu *Clostridium* spp. sayılmak/ aranmak istenirse materyal 80 °C'ta 1 dk tutularak pastörize edilebilir.

Yöntemin Uygulanışı

Homojenizasyon ve seyreltmelerde "*anaeroplar için seyreltme çözeltisi*" kullanılır. Bu amaçla *MRD* ya da benzeri bir genel homojenizasyon ve seyreltme çözeltisi kullanılıyor ise analiz talimatında ve/veya analiz raporunda bu kullanım belirtilmelidir.

Katı Besiyerinde Sayım

Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre sıvı örnekten ya da katı gıdaların homojenizatından ve/veya uygun seyrelti(ler)den *reinforced clostridial agara* yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır. Amaca/ ilgili standarda uygun başka katı besiyeri de kullanılabilir. Bu amaçla *sulpfite iron agar* ve differential clostridial agar en çok kullanılan besiyerleridir.

Petri kutuları 35-37 °C'ta 24-48 saat süre ile anaerop ortamda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon için anaerop kavanoz ve anaerop ortam sağlayan kitlerin kullanılması önerilir. Bu sürenin sonunda gelişen bütün koloniler "mezofil anaerop bakteri" olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak sonuç KOB/g(mL) olarak verilir.

Not: *Reinforced clostridial agar* besiyerinde koliform grup bakteriler ve *Staph. aureus* gelişebilir. İdentifikasyon esaslı sayım tekniği (bknz ⇒ 08.01.02. Bölüm) uyarınca Gram boyama yapılarak kolonilerin Gram reaksiyonu ve bakteri morfolojilerinin incelenmesi önerilir. Gram negatif bakterilerin baskılanması için sterilizasyon sonrası besiyerine 0,02 g/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş *polymyxin B sulfate* çözeltisi ilave edilmelidir.

EMS Yöntemi ile Sayım

En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak *reinforced clostridial medium*, *fluid thioglycollate broth* ya da *thioglycollate broth* tüplerine ekim yapılır. Gerekiyorsa besiyerleri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır (bknz⇒ 04.03.04. Bölüm).

Ekim sırasında pipetin olabildiğince tüpün dibine doğru sokularak materyalin buraya aktarılmasına dikkat edilir.

Ekim sonrasında tüplerin üzerine ~1 cm kalınlıkta (~2 mL) steril katı parafin ya da *su agar* ilave edilmelidir. Tüpler 35-37 °C'ta 24-48 saat süre ile ve tercihen anaerop ortamda inkübe edilir.

Not 1: *Fluid thioglycollate medium* taze hazırlanmalıdır. Eğer tüpteki besiyerinin üstten 1/3'lük bölümünde oksijene bağlı olarak pembe renk oluşmuş ise ve bu renk kaynatma ile kaybolmuyorsa bu besiyeri analizde kullanılamaz. Besiyeri sadece bir kez kaynatılabilir.

Not 2: *Reinforced clostridial medium* besiyerinde koliform grup bakteriler ve *Staph. aureus* gelişebilir. Gram negatif bakterilerin baskılanması için sterilizasyon sonrası besiyerine 0,02 g/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş *polymyxin B sulfate* çözeltisi ilave edilmelidir.

Var/yok Testi

Anaeroplar açısından da "steril" sayılan UHT süt gibi ürünlerde yaygın olarak uygulanır. Bu amaçla *fluid thioglycollate medium*, *thioglycollate broth* ya da *reinforced clostridial medium* gibi bir selektif ortamda zenginleştirme ve arkasından *reinforced clostridial agar* besiyerine ekim yapılır. İnkübasyonlarda standart olarak anaerop ortam önerilir. Var/ yok analiz kurallarına uyularak sonuç verilir.

14.04. Maya ve Küfler

Gıdalardaki maya ve küfler hakkında genel bilgiler 09.07. bölümde verilmiştir. Gıdalarda mikrobiyolojik kalite göstergesi olarak sayılır/ aranırlar. Genel olarak selektif bir katı besiyerinde maya ve küfler beraberce sayılır. Maya hücrelerinin çoğalma hızı bakterilerde olduğu gibidir, ancak küfler mayalara kıyasla daha yavaş çoğalırlar. Buna bağlı olarak standart analizlerde maya ve küf sayımında inkübasyon süresi 5 gün olarak verilir. İnkübasyon sonunda maya ve küf kolonileri görsel olarak çok net bir şekilde ayrılır. Gerekirse inkübasyonun 48. saatinde henüz küf kolonileri oluşmamışken Petri kutusu tabanında maya kolonileri işaretlenebilir.

Maya türlerinin fakültatif anaerop olmalarına karşın küflerin tümü aeroptur. Toplam aerobik bakteri sayımında olduğu gibi kimi uluslararası kaynaklar dökme yöntemi ile maya ve küf sayımı yapılabileceğini, ancak küf gelişmesinde sorun yaşanabileceğini uyarmaktadırlar. Dolayısı ile maya ve küf analizi her koşulda aerop ortamda yapılmalıdır. Aynı şekilde standart EMS yöntemi ile küf sayımı yapılamaz ama standart EMS yöntemi ile ozmofilik/ ozmotolerant maya sayımı yapılabilir.

Bakterilerin Baskılanması

Maya ve küf analiz besiyerlerinde bakterilerin gelişmesi asitlendirme ve antibiyotik ilavesi ile sağlanır. Asitlendirme için en tipik örnek *potato dextrose agar* besiyeridir. Bu besiyerinin otoklav sonrası pH'sı 5,6±0,2'dir ve çoğu bakterinin gelişmesi bu pH'da baskılanır Analiz edilen numunede yoğun bakteri yükü varsa tartarik asit ile pH ~3,5'e düşürülür.

Maya ve küf besiyerlerine bakteri gelişmesini engellemek için antibiyotik ilavesi de mümkündür ve bu amaçla en yaygın olarak kullanılan antibiyotik otoklavlama işlemine dirençli olan kloramfenikoldür ve 100 mg/L konsantrasyonda kullanılır. Bakteri yükü çok fazla ise kloramfenikol içermeyen bazal besiyerine 50 mg/L kloramfenikol eklenir, otoklav sonrasında 45-50 ^{o}C'ta tutulan agarlı besiyerine 50 mg/L konsantrasyonda olacak filtre ile sterilize edilmiş klortetrasiklin eklenir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür.

Ticari olarak hazırlanmış bazı maya ve küf besiyerlerinin bileşiminde zaten kloramfenikol olduğuna dikkat edilmelidir.

Standart Yöntemin Uygulanışı

Diğer çoğu gıda analizinden farklı olarak standart maya ve küf sayımında analiz edilecek gıdanın su aktivitesine göre farklı homojenizasyon/ seyreltme çözeltileri ile farklı besiyeri kullanılır. Buna göre esas alınan değer $A_s > 0,95$ ve $A_s \leq 0,95$'tir.

Su aktivitesi 0,95'ten yüksek ($A_s > 0,95$) olan gıda numunelerinin homojenizasyonu ve seyreltilmesi için %0,1 pepton çözeltisi kullanılır. Gerekirse küf sporları ve konidilerin kümeleşmesini önlemek için homojenizasyon çözeltisine %0,05 Tween 80 ilave edilebilir. Bu grup gıdalar için kullanılan besiyeri *dichloran-rose bengal chloramphenicol agar (DRBC)*'dir. Bu besiyeri *Byssochlamys fulva ve Byssochlamys nivea* gibi ısıya dirençli küflerin analizi için uygun değildir.

Su aktivitesi 0,95 ya da daha altındaki gıdaların analizinde homojenizasyonu ve seyreltilme için genel amaçlı olarak %0,1 pepton çözeltisi kullanılır. Bu grup gıdalar için kullanılan besiyeri *dichloran 18% glycerol agar (DG18)*'dir.

Her iki besiyeri de ışığa duyarlıdır, ışık varlığında oluşan sitotoksik parçalanma ürünleri gerçek sayıdan daha az sayım sonucu alınmasına neden olabilir.

Maya ve küf analizlerinde *potato dextrose agar* ve malt extract agar besiyerleri de amaca uygun olarak kullanılabilir. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (International Dairy Federation; IDF) süt ve ürünlerinde maya küf analizi için *yeast extract glucose chloramphenicol (YGC) agar* önermektedir. FDA'ya göre 100 mg/L kloramfenikol eklenmiş *PCA*, yayılıcı küflerin olmadığı koşullarda maya ve küf sayımı için kullanılabilir.

Ozmofilik/ Ozmotolerant Mayalar ve Kserofil Küfler

Bu grup maya ve küflerin analizinde *dichloran 18% glycerol agar* kullanılır. Hücreleri ozmotik şoktan korumak için homojenizasyonda ve gerekli ise seyreltmelerde %20-35 gliserol ya da aynı derişimde glikoz çözeltisi kullanılmalıdır. Kullanılan çözeltinin derişimi analiz raporlarında belirtilmelidir.

Uluslararası Meyve ve Sebze Suyu Derneği (International Fruit and Vegetable Juice Association; IFU), ozmofilik ve ozmotolerant mayalar için iki ayrı besiyeri önermiştir.

Yabani Maya (non-Sacch) Analizi

Başta şarap olmak üzere çeşitli endüstriyel fermantasyonlarda yabani mayaların varlığı istenmez. Bunlar genel olarak *Saccharomyces* olmayan anlamında non-Sacch olarak tanımlanır. Yabani mayaların analizinde lysine medium kullanılır. Bu besiyerinde yegâne azot kaynağı lisindir ve *Saccharomyces* türleri lisini kullanamazken yabani mayalar bu besiyerinde kolaylıkla gelişebilir. Bu besiyeri, hazır ticari preparat olarak sağlanabilir.

Isıya Dayanıklı Küfler

Byssochlamys fulva, *B. nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces macrosporus*, *T. bacillisporus* ve *Eupenicillium brefeldianum* ısıya dayanıklı küfler arasında en yaygın olanlardır. Genellikle pastörize meyve sularında sorun çıkarırlar. Askosporların germinasyonu sonucunda oluşan miseller ve kimi türlerin pektolitik enzim faaliyeti sonunda ekonomik kayıplar oluşur. Ayrıca bu türlerin bazıları patulin ve diğer mikotoksinleri de oluştururlar.

Isıya dirençli küflerin analizinde numune 75-80 °C'ta 30 dk pastörize edilir. Bu işlem sırasında maya ve küfler ile bakterilerin vejetatif formları ve maya sporları ölür. Isıl işlem sonrası standart yöntemlerle *potato dextrose agar* ya da malt extract agar besiyerine ekim yapılır. 28 °C'ta 30 güne kadar inkübasyon yapılır, ancak genellikle 5. günde küf kolonileri görülmeye başlar. Uzun süren inkübasyonda inkübatörün nemli olması sağlanmalıdır. İnkübatöre ıslak bez bırakılması ile yeterli nem sağlanabilir. Söz konusu bezin sürekli ıslak kalması sağlanmalıdır.

Hava ve Yüzey Analizleri

Mikroorganizmalar havada genellikle bakteri ve küf sporları olarak, ancak yüzeylerde tüm formlarda bulunabilirler. Dolayısıyla çalışma atmosferinde genellikle toplam bakteri ile maya-küf besiyerleri kullanılır. Hava ve yüzeylerin analizi 07.02.06. bölümde verilmiştir.

14.05. Toplam *Enterobacteriaceae*

Toplam *Enterobacteriaceae* hakkında 09.08. Bölümde bilgi verilmiştir. Katı besiyerinde sayım yanında gerek EMS yöntemi ile sayım ve gerek var/yok testlerinde standart besiyerinde gelişen tipik kolonilere oksidaz testi (bknz⇒ 06.04.03.09. bölüm) ve glikoz fermantasyonu testi (bknz⇒ 06.04.03.10. bölüm) uygulanmalıdır. *Enterobacteriaceae* üyeleri oksidaz (–) ve glikoz (+) reaksiyon verirler. Glikoz fermantasyonu testinin *OF mediumda* yapılması önerilmektedir.

Bu sürenin sonunda tipik kolonilerden en az 5 adedi nutrient agar ya da *tryptic soy (CASO) agar* gibi genel bir katı besiyerine sürülür 37 °C'ta 24±2 saat inkübasyondan sonra önce oksidaz testi yapılır, oksidaz negatif olan koloniler glikoz OF besiyerine aktarılır.

Standart Koloni Sayım Yönteminin Uygulanışı

Gıda numunesinde beklenen/ hedeflenen sayıya göre standart yöntemle yayma ya da dökme plak yöntemi uygulanır. *Enterobacteriaceae* analizinde pek çok ulusal/ uluslararası standarda göre *violet red bile dextrose (VRBD) agar*[2] kullanılır. İnkübasyon parametresi standart olarak 37 °C'ta 24 saat olarak verilmektedir, ancak inkübasyon sıcaklılığı olarak 30 °C uygulamalara da çeşitli uluslararası standartlarda rastlanmaktadır. Analiz raporunda inkübasyon sıcaklığı belirtilmelidir. Yayma ya da dökme yöntemi ile yapılan ekimden sonra 45-50 °C'ta tutulan aynı besiyerinden ikinci kat olarak 5-10 mL ilave edilmesi, yine pek çok uluslararası standartta önerilmektedir. Bu şekilde kolonilerin yayılmasının önüne geçilmiş olur. İnkübasyon bitiminde tipik kolonilere oksidaz ve glikoz fermantasyon testleri uygulanmalıdır.

EMS Yöntemi ile Sayım

Enterobacteriaceae üyelerinin EMS yöntemi ile sayımında standart seyreltmeler yapıldıktan sonra en yaygın olarak *Salmonella* analizinde ön zenginleştirme amacı ile kullanılan *tamponlanmış peptonlu* su besiyerine ekim ve 37±1 °C'ta 18±2 saat inkübasyondan sonra gelişme görülen (bulanıklık olan) tüm tüplerden *VRBD agar* besiyerine sürme yapılır. İnkübasyon sonrası tipik koloniler, katı besiyerinde sayım uygulamasında verildiği gibi tanımlanır ve standart EMS kurallarına göre sonuç hesaplanır.

Önceki standartta tamponlamış peptonlu suda selektif olmayan zenginleştirmenin ardından EE brothta selektif zenginleştirme ve *VRBD agara* ekim olmakla birlikte yeni standartta (ISO 21528-1:2017) EE broth aşaması çıkartılmıştır.

Var/yok Analizi

Amaca uygun miktarda gıda numunesi 9 misli hacmindeki *tamponlanmış peptonlu suya* eklenir ve işlem EMS yönteminde verildiği gibi devam eder.

14.06. Koliform Grup Bakteriler

Koliform grup bakteriler hakkında 09.09. bölümde bilgi verilmiştir. Tüm koliform grup bakterilerin analizinde bunların laktozdan asit ve gaz oluşturmaları esas alınır. Gaz oluşturma, çok genel olarak sıvı besiyerindeki Durham tüpünde gaz birikmesi (bknz⇒ Şekil 04.02) ile ve asit oluşturmaları ise katı besiyerlerindeki pH indikatörleri ile belirlenir. Bununla beraber koliform grup analizlerinde kullanılan sıvı besiyerlerinde pH indikatörü yoktur, dolayısı ile laktozdan asit oluşturulması bu besiyerlerinde belirlenemez.

[2] Bu besiyeri ismi, kimi kaynaklarda violet red bile glucose (VRBG) agar olarak kullanılmaktadır.

Koliform grup bakteri analizi, gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında en sıklıkla uygulanan analizler arasındadır.

14.06.01. Koliformlar; Katı Besiyeri Kullanımı

Koliform grup bakterilerin katı besiyeri kullanılarak yapılan analizinde, ISO ve FDA gibi pek uluslararası standart *violet red bile (VRB)*[3] *agar* önerir. Amaca göre dökme ya da yayma kültürel ekim yöntemiyle analiz edilir. Ekim sonrası besiyeri jelleştikten sonra kimi kaynaklar, erimiş halde 40-45 °C'ta tutulan VRB agardan 5-10 mL olacak şekilde 2. kat dökülmesini önerir. Yöntem şematik olarak Ek A02'de verilmiştir.

Analiz edilen numunedeki koliformların hasar görmüş olmasından endişe ediliyorsa ekimin *tryptic soy (CASO) agar* besiyerine yayma kültür ile yapılması, besiyeri kültürü emdikten sonra erimiş halde 45-50 °C'ta tutulan VRB agardan 5-10 mL olacak şekilde 2. kat dökülmesi de çeşitli standartlarda yer almıştır.

İnkübasyon sıcaklığı olarak 30 ya da 37 °C kullanılabilir. FDA süt ürünlerinde koliform analizi için 32 °C önermektedir. İnkübasyon süresi 24 saat olmakla birlikte koloni gelişmesi olmaz ise inkübasyona 48 saate kadar devam edilebilir, ancak çok genel olarak sonuçlar ilk 24 saatte alınır. Analiz raporunda inkübasyon sıcaklığı ve süresi belirtilmelidir.

Bu grup bakterilerin analizinde kullanılan ENDO agar, EMB agar vb. başka katı besiyerleri de vardır, ancak bu gibi katı besiyerlerinin kullanımı VRB agar kadar yaygın değildir.

Doğrulama

En az 10 adet tipik morfolojideki koloni, *brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2%* besiyerine ayrı ayrı inokülasyonu ve 35 °C'ta 24-48 saat sonra Durham tüplerinde gaz oluşumu izlenmelidir. Bu besiyerinde gaz oluşumu koliform grup bakterileri doğrular. Eğer *BGLB broth* tüpünde üstte zar varsa Gram pozitif laktoz fermente eden basil[4] varlığı açısından Gram boyama yapılarak kontrol edilmelidir.

---

[3] *Enterobacteriaceae* analizinde kullanılan VRBD (VRBG) agarla karıştırılmaması için pek çok kaynakta violet red bile lactose (VRBL) olarak verilir.

[4] Basil, çomak (küçük çubuk) demektir. Günlük kullanımda *E. coli* anlamında koli basili, *Bacillus* gibi ifadeler sadece bakterinin çubuk formunda olduğunu gösterir.

14.06.02. Koliformlar; EMS Yöntemi

Koliform grup bakterilerin EMS yöntemi ile sayılmasında ISO ve FDA başta olmak üzere pek çok uluslararası standart, *lauryl sulfate tryptose (LST) broth* besiyerini önerir. Bu besiyeri, farklı standartlarda lauryl tryptose broth ya da lauryl sulphate broth olarak da anılır. Analiz yöntemi Ek A03'te şematik olarak verilmiştir.

Standart EMS yöntemiyle yapılan ekim ve inkübasyon sonunda Durham tüplerinde gaz oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilir. İnkübasyon 30 ºC ya da 37 ºC'ta yapılır. Çeşitli uluslararası standartlarda süt ve ürünlerinde koliform grup bakteri analizi yapılırken inkübasyon sıcaklığının 30-32 ºC olması önerilir. İnkübasyon süresi 24 saattir, ancak gelişme olmayan tüpler 48 saate kadar inkübe edilir.

Çeşitli uluslararası standartlarda pozitif tüplerden *BGLB broth* besiyerine aşılama yapılarak 30 ya da 37 ºC'ta 24 saat inkübe edilmesi, bu süre sonunda Durham tüplerinde gaz görülmesi ile doğrulama yapılması istenir.

EMS yöntemi ile koliform grup bakteri analizinde lactose broth, MacConkey broth vb. besiyerleri de kullanılabilir ancak bu gibi sıvı besiyerlerinin kullanımı LST broth kadar yaygın değildir.

14.06.03. Koliformlar; Membran Filtrasyon

Başta içme ve kullanma suları olmak üzere çeşitli gıdalarda ve çevre numunelerinde koliform grup bakteri sayılması/ aranması, membran filtrasyon yöntemiyle yapılır. Amaca ya da beklenen sayıya göre 100 ya da 250 mL su, membran filtreden geçirildikten sonra filtre uygun bir besiyeri üzerine yerleştirilip inkübasyona bırakılır. Yöntem, Ek A04'te şematik olarak verilmiştir.

İçme ve kullanma sularının membran filtrasyonla yapılan standart analizinde önceden lactose TTC agar with Tergitol® 7 besiyeri kullanılırken TS EN ISO 9308-1 numaralı standart 2014 yılında revize edilmiş ve *chromogenic coliform agar (CCA)* besiyeri kullanımı getirilmiştir. Bu besiyerinin en büyük avantajı *E. coli* ile diğer koliform bakterilerin koloni morfolojisine göre net bir şekilde ayrılabilmesidir.

Düşük bakteriyolojik içeriğe sahip arıtılmış suların membran filtrasyon ile analizinde kullanılan CCA besiyeri, 35-37 ºC'ta sadece 24 saat inkübe edilir. 24 saat inkübasyon sonunda yapılan okumalar geçersizdir.

Membran filtrasyonla toplam koliform grup bakteri analizinde bu gruba özgü tüm katı besiyerleri de (*VRB agar*, ENDO agar, EMB agar, MacConkey agar vd.) kullanılabilir.

14.06.04. Koliformlar; Var/yok Analizi

Herhangi bir gıda numunesinin belirli bir ağırlığında (ya da hacminde) koliform grup bakteri var/yok analizi için;

-Numune uygun ise membran filtrasyon ile analiz edilebilir,

-50 ya da 100 mL su numunesi *Readycult Coliforms* (bknz⇒ Ek A05) ile analiz edilebilir,

-Standart var/yok analiz kurallarına göre numune ağırlığının (ya da hacminin) 9 misli hacimde uygun bir selektif besiyeri hazırlanır, standart yöntemle devam edilir. *LST broth* ve *BGLB broth* besiyerlerinde koliform grup bakteriler, laktozdan gaz oluşturmaları ile belirlenir. Yüksek hacimlerde Durham tüpü kullanmak teknik olarak zordur. Dolayısıyla Durham tüpü kullanılmasına gerek olmayan *LMX broth* uygun bir besiyeridir. Standart yöntemle yapılan analizi sonunda besiyeri renginin mavi-yeşil olması koliform grup bakteri varlığına işaret eder. İstenirse VRBL agara sürme yapılarak doğrulama yapılabilir. Numunede hasar görmüş koliformlar olduğundan endişe ediliyorsa tamponlanmış peptonlu suda selektif olmayan ön zenginleştirme ile analize başlanıp ardından içinde Durham tüpü bulunan 10 mL LST broth ile devam edilebilir.

Su numunesinde koliform bakteri varlığı basitçe *Readycult Coliforms* ile analiz edilebilir. Bu sistemin özelliği dehidre broth şeklinde hazırlanmış steril preparatın analiz edilecek su numunesine eklenmesi ve inkübasyona bırakılmasıdır. Bir anlamda su numunesi, besiyeri hazırlamak için kullanılacak su yerine geçmektedir. İnkübasyon süresi 35-37 ^{o}C'ta 24 saattir. Eğer inkübasyon oda sıcaklığında (20-25 ^{o}C) yapılırsa süre 48 saat olmalıdır. *Readycult Coliforms*, 50 ve 100 mL hacimde su numuneleri için kullanılır. İnkübasyondan sonra besiyeri renginin mavi-yeşil olması koliform grup bakteri varlığına işaret eder.

14.06.05. Koliformlar; Yüzey Analizleri

Koliform grup bakterilerin başta çalışma tezgâhları, çalışanların elleri ve kıyafetleri vb. yüzeylerde varlıklarının belirlenmesi için çeşitli özel besiyerleri ve sistemler geliştirilmiştir. Bunlar, 16. Hijyen Analizleri bölümünde verilmiştir.

14.07. Fekal Koliformlar

Fekal koliformlarla ile ilgili genel bilgiler 09.09. bölümde verilmiştir. Gıdaların standart rutin analizinde fekal koliform analizi yoktur, ancak ticarette alıcı firma *E. coli* yerine fekal koliform analizi isteyebilmektedir. Bu şekilde fekal kontaminasyon daha geniş bir biçimde belirlenmiş olur.

E. coli, gıdaların analizinde fekal koliform olarak saptananların büyük çoğunluğunu oluşturur, ancak bazı gıda ve çevre numunelerinde *E. coli* olmadığı halde diğer fekal koliformlara rastlamak mümkündür.

Bu grubun analizinde kullanılan özel bir katı besiyeri yoktur, sadece standart koliform bakterilerin analizinde kullanılan besiyerlerinin 44 °C'ta inkübasyonu ile analiz yapılır. Standart bir yöntem olmasa da ekimi yapılmış *VRB agarın* doğrudan 44 °C'ta 24 saat inkübasyonu sonunda oluşan tipik koloniler fekal koliform olarak sayılır. Bu uygulamada besiyerinin inkübasyon süresince kurumaması için besiyerinin kalın (~20 mL) dökülmesi ve/veya Petri kutusunun mutfak tipi streç filme sarılarak inkübasyona bırakılması önerilir.

Suların membran filtrasyon ile analizinde kullanılan mFC (membran Fecal Coliform) besiyerinin fekal koliformlar lehine hiçbir selektivitesi olmadığı ve eğer inkübasyon 37 °C'ta yapılırsa tüm koliform bakterilerin aynı şekilde gelişeceği unutulmamalıdır.

EMS yöntemiyle *E. coli* sayılmasında *LST broth* besiyerinde gelişme ve gaz oluşturan tüplerden *EC brotha* aşılama yapılıp 44 °C'ta 24-48 saat inkübasyondan sonra gelişme ve gaz görülen tüpler fekal koliform olarak değerlendirilir.

14.08. *E. coli* (biyotip 1)

E. coli ile ilgili genel bilgiler 09.09. bölümde verilmiştir. Kamu ve özel sektöre ait laboratuvarlarda yapılan gıdaların mikrobiyolojik analizinde en fazla aranan/ sayılan bakterilerin başında gelir.

Fekal kontaminasyon göstergesi olduğu için prensip olarak doğrudan tüketilen gıdalarda *E. coli* bulunması istenmez. Ancak mandıra tipi peynirlerde olduğu gibi çeşitli gıdalarda hammadde pastörize edilmiş olsa dahi *E. coli* bulaşmasından tümüyle kaçınmak neredeyse olanaksızdır. Buna bağlı olarak bazı gıdalarda *E. coli* analizi yapılmaz ama bunun yerine *Salmonella* ve *E. coli* O157 analizi yapılır. Böylece gıdalarda potansiyel olarak bulunabilen enterik patojenlerin göstergesi olan *E. coli* yerine doğrudan enterik patojenler aranmış olur. Bu gibi gıdalarda *E. coli* varlığının kontrol edilmemesi halk sağlığı açısından bir eksiklik değildir, çünkü *E. coli* sadece bir indikatördür.

Sadece *E. coli* belirlemeye yönelik tam selektif bir besiyeri yoktur[5] ve çok genel olarak koliform grup bakteriler ile beraber analiz edilir. Çoğu standart analiz yönteminde önce toplam koliform bakteriler belirlenir ve bunların içinde *E. coli* olanlar araştırılır. Buna göre analizi yapılan bir gıdada hiçbir koşulda *E. coli* sayısı toplam koliform sayısını geçemez ama eşit olabilir. Bir diğer deyişle gıda numunesinde *E. coli* dışında koliform olmaması mümkündür.

[5] Ekimi yapılmış VRBL agar + MUG besiyerinin 37 °C'ta inkübasyonu ve ardından MUG reaksiyonu ile doğrudan ve sadece *E. coli* belirlenebilir. Bu uygulamada diğer koliform bakteriler de bu besiyerinde floresan ışıma vermeden gelişebilirler. Bu besiyerinin 44 °C'ta inkübasyonunda *E. coli* olmayan fekal koliformlar da yine floresan ışıma vermeden gelişebilir.

E. coli analizinde kullanılan tüm besiyerlerinde diğer koliform bakteriler de kolaylıkla gelişir. *E. coli*, diğer koliformlardan 3 temel özelliği ile ayrılır ve özellikler *E. coli* analizinde öne çıkar. Bunlar β-D-glucuronidase enzimi varlığı, indol pozitif olması ve 44 ºC'ta gelişebilmesidir.

β-D-glucuronidase enzimi

Bu enzim yapısal olarak *E. coli* serotiplerinin çok büyük bir çoğunluğunda bulunur, ancak *E. coli* O157:H7 serotipi bu enzime sahip değildir. Nadir olarak bulunan bazı *Salmonella* ve *Shigella* izolatlarında da bu enzimin varlığı gösterilmiştir. Gıdaların ve çevre numunelerinin *E. coli* açısından rutin analizinde bu enzime sahip olan *Salmonella* ve *Shigella* suşları laktoz negatif olmaları nedeni ile koliform/ *E. coli* analizlerinde belirlenemez. Çok nadir olmak üzere analiz edilen gıda numunesinde koliform grup var, *E. coli* yok, β-D-glucuronidase enzimine sahip *Salmonella* ve/veya *Shigella* var olduğunu varsayalım. LST broth + MUG besiyerinde EMS ile yapılan sayımda koliform grup bakteriler laktozdan gaz oluşturacaktır. Ardından aynı tüpteki *Salmonella* ve/veya *Shigella* suşları MUG pozitif reaksiyon verebilir. Bu sonuç, sahte *E. coli* varlığını gösterir, ancak halk sağlığı açısından kayıp değil tam tersine kazanç olarak değerlendirilir.

β-D-glucuronidase enzimi diğer koliform grup bakterilerde yoktur. Dolayısı ile standart koliform grup/ *E. coli* analizlerinde koliformlar arasında bu enzime sahip olan *E. coli*, kolaylıkla diğer koliform grup bakterilerden ayrılabilir.

E. coli O157:H7 dışındaki *E. coli* serotiplerinde yapısal olarak bulunan β-D-glucuronidase enzim varlığı, *E. coli* analizine yönelik olarak kullanılan çeşitli besiyerlerinde farklı substratlar kullanılarak belirlenir. 4-Methylumbelliferyl-ß-glucuronide (MUG) ve X-glucuronide, bu substratların en yaygını olanlarıdır. MUG substratının kullanıldığı besiyerlerine *VRBL agar*, *LST broth*, *LMX broth* (⇒ *Readycult Coliforms*), X-glucuronide substratının kullanıldığı besiyerlerine ise *Tryptone Bile X glucoronide (TBX) agar* ve *CCA* örnek verilebilir.

β-D-glucuronidase enzimi, etki ettiği substratı parçalar. Parçalanma ürünleri, floresan ışıma ya da tipik koloni rengi olarak belirlenir.

İndol pozitif olma özelliği

Koliform grup bakteriler içinde indol pozitif olan tek bakteri *E. coli* biyotip 1'dir. Nadir olarak rastlanan *E. coli* biyotip 2 ise indol negatiftir. İndol pozitif olma özelliği, tipik koloniye hızlı doğrulama avantajı sağlar. *CCA* besiyeri bileşiminde triptofan vardır, koloniye doğrudan indol testi yapılabilir.

Triptofan, *LST+MUG* ve *Readycult Coliforms* besiyerlerinde de vardır. Bu iki besiyerinde indol testi, aşağıda ilgili bölümlerde açıklanmıştır.

44 ºC'ta gelişebilme özelliği

E. coli dâhil olmak üzere bütün fekal koliform bakteriler 44ºC'ta gelişebilir. Fekal olmayan koliform grup bakteriler bu sıcaklıkta gelişemezler.

14.08.01. *E. coli*; Katı Besiyeri Kullanımı

Bu amaçla en yaygın kullanılan katı besiyerleri *TBX agar*, *VRB agar+MUG* ve *CCA*'dır. Yöntem, Ek A06'da şematik olarak verilmiştir.

TBX agar, ISO 16649'a uygundur. *E. coli* (biyotip 1)'deki yapısal enzim olan β-D-glucuronidase enzimi, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-β-D-glucuronide) kromojenik substratını parçalar ve böylece *E. coli* kolonileri mavi-yeşil renk alır. Besiyeri bileşimindeki substratın kromojenik karakterde olması nedeniyle koloni rengi zamanla değişmez.

VRB+MUG agar, tipik bir florojenik besiyeridir. İnkübasyondan sonra pozitif reaksiyonun belirgin olması amacıyla loş bir ortamda uzun (~366 nm) dalga boylu ultraviyole (UV) lamba ile floresan ışıma veren koloniler *E. coli* olarak sayılır ya da izole edilir. Petri kutusunda yoğun *E. coli* varlığına bağlı olarak floresan ışıma yayılması bir çeşit ışık kirliliği oluşturabilir ve hangi kolonilerin ışıma yaptığı net olarak anlaşılamayabilir. Bu nedenle VRB agar+MUG besiyerinin 18 saatten daha uzun süre ile inkübe edilmemesi gerekir. Bu analizde kullanılan UV lambası mutlaka uzun dalga boylu olmalıdır[6].

CCA besiyerinde bütün koliform bakterilerde bulunan ß-D-galactosidase enzim aktivitesi sonunda *E. coli* dâhil olmak üzere koliformlar pembe-kırmızı koloni oluşturur. Aynı zamanda sadece *E. coli* biyotip 1'de bulunan β-D-glucuronidase enzimi, X-glucuronide substratını parçalar ve *E. coli* kolonisinin mavi renk almasını sağlar. Bir diğer deyişle *E. coli* kolonisindeki mavi renk, aynı kolonideki kırmızı rengi baskılar ve sonuçta *E. coli* kolonisi mor-menekşe renk gösterir. *CCA*, düşük selektiviteye sahip bir besiyeridir. İçme ve kullanma suları gibi düşük refakatçi flora varlığında bu besiyeri katkı ilave edilmeksizin kullanılır, ancak bu şekildeki kullanımda inkübasyon süresi 24 saattir ve daha sonraki okumalar geçersizdir. Bir anlamda besiyerinin selektivite gücü ancak 24 saate kadardır, sonrasında koliform olmayan başka bakteri türleri pembe-kırmızı ve/veya mavi-mor koloniler oluşturarak sahte pozitif sonuçlara neden olabilir. Refakatçi floranın yoğun olduğu gıda ve çevre numunelerinde selektivitesi artırılmış CCA ES (Enhanced Selectivity) kullanılması gerekir.

[6] Uzun dalga boylu UV ışınları, UV-A olarak tanımlanır. Havanın, sıvıların ve düzgün yüzeylerin sterilizasyonu için kullanılan kısa dalga boylu UV ışınları (UV-C) MUG reaksiyonunun belirlenmesinde kullanılamaz. Önceden sahte para sayma makinelerindeki UV lambalar bu amaçla kullanırken yeni nesil sahte para makineleri bu amaçla kullanılamaz.

14.08.02. *E. coli*; EMS Yöntemi

Analiz, 14.07. Fekal Koliformlar bölümünde verildiği şekilde başlar. İnkübasyon sonunda gelişme olan ve Durham tüplerinde gaz görülen EC broth tüplerinden *tryptone water*[7] olan tüplere aşılama yapılır ve tüpler 44 ºC'ta 24-48 saat inkübe edilir. Gelişme görülen tüplere indol testi uygulanır, indol pozitif sonuçlar *E. coli* olarak değerlendirilir (indol testi için bknz⇒ 06.04.03.01. bölüm).

Standart EMS yöntemiyle analiz en az 3 gün sürer. *LST+MUG* broth kullanılarak EMS yöntemiyle yapılan analiz ise 24-48 saat sürer ve inkübasyonda 44 ºC'a gerek yoktur. İnkübasyondan sonra gelişme ve gaz görülen tüpler koliform grup bakteri olarak işaretlenir. Bu tüpler, loş bir ortamda uzun dalga boylu UV lamba altında incelenir. Floresan ışıma verenler *E. coli* olarak değerlendirilir. Yöntem, Ek A07'de şematik olarak verilmiştir.

Tüplerde gelişme var, ancak gaz yoksa floresan ışıma testi yapılmaz.

Bazı *E. coli* suşları *LST+MUG* besiyerinde aşırı asitlik oluşturur ve bu asitlik floresan ışımayı maskeleyebilir. Floresan ışımanın net bir şekilde belirlenemediği koşulda tüpe 1 mL 1 N NaOH eklenir ve asitlik nötralize edilip yeniden incelenir.

Kimi kaynaklar floresan pozitif tüplere indol testi yapılarak *E. coli* doğrulamasını önermektedir. Tüpe NaOH ilave edilmiş olması indol testini etkilemez. İndol testinden sonra yeniden floresan ışıma değerlendirmesi yapılmaz. *Fluorocult LST broth* besiyerinde triptofan olduğu için doğrudan indol testi yapılabilir[8].

İndol testi bir anlamda *E. coli* doğrulaması için yapılır ve çeşitli araştırmalar bu testin çok gerekli olmadığını göstermiştir. Tersine olarak *Fluorocult LST brothta* floresan negatif tüplere indol testi yapmak daha anlamlıdır. *E. coli* O157:H7 serotipinde β-D-glucuronidase enzimi yoktur, dolayısıyla MUG'lu besiyerlerinde floresan ışıma vermez ve *E. coli* dışındaki koliform bakteri olarak değerlendirilir. Floresan ışıma negatif tüplerde indol pozitif sonuç alınırsa *E. coli* O157:H7 serotipi varlığı kuvvetle muhtemeldir. İndol testi yapılmış tüpten herhangi bir bakteri izole edilemez. Dolayısı ile analiz edilen numunede *E. coli* O157:H7 serotipi varlığından şüphe ediliyorsa gaz pozitif ve floresan negatif tüplerden indol testi öncesinde steril bir tüpe 1-2 mL aktarılıp sonra indol testi yapılmalıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi gaz pozitif, MUG negatif ama indol pozitif karakter gösterir. Böyle bir sonuç alındığında indol testi öncesinde ayrılmış olan 1-2 mL kültürden *E. coli* O157:H7 serotipi analizine devam edilir.

[7] Bu besiyeri, tryptophane broth ve tryptone broth olarak da bilinir.

[8] Standart LST broth besiyerinde triptofan yoktur, dolayısı ile gelişme görülen tüplere indol testi yapılamaz. Bu tüplerde indol testi her koşulda negatif sonuç verir.

14.08.03. *E. coli*; Membran Filtrasyon

Başta içme ve kullanma suları olmak üzere çeşitli gıdalarda ve çevre numunelerinde *E. coli* sayılması/ aranması, membran filtrasyon yöntemiyle yapılır. Amaca ya da beklenen sayıya göre 100 ya da 250 mL su, membran filtreden geçirildikten sonra filtre uygun bir besiyeri üzerine yerleştirilip inkübasyona bırakılır.

İçme ve kullanma sularının membran filtrasyonla yapılan standart analizinde TS EN ISO 9308-1 numaralı standart 2014 yılında revize edilmiş ve *CCA* besiyeri kullanımı getirilmiştir. Bu besiyerinin en büyük avantajı *E. coli* ile diğer koliform bakterilerin koloni morfolojisine göre net bir şekilde ayrılabilmesidir. 14.08.01. Bölümde *CCA* besiyerinde ayrıntılı bilgi verilmiştir.

Düşük bakteriyolojik içeriğe sahip arıtılmış suların membran filtrasyon ile analizinde kullanılan CCA besiyeri, 35-37 ºC'ta sadece 24 saat inkübe edilir. 24 saat inkübasyon sonunda yapılan okumalar geçersizdir.

Membran filtrasyonla *E. coli* analizinde, bu bakteriye özgü tüm katı besiyerleri de (*VRB + MUG agar*, *TBX agar* vd.) kullanılabilir.

14.08.04. *E. coli*; Var/yok Analizi

Herhangi bir gıda numunesin, belirli bir ağırlığında (ya da hacminde) *E. coli* var/ yok analizi için;

-Numune uygun ise membran filtrasyon ile analiz edilebilir,

-50 ya da 100 mL su numunesi *Readycult Coliforms* ile analiz edilebilir,

-Standart var/yok analiz kurallarına göre numune ağırlığının (ya da hacminin) 9 misli hacimde uygun bir selektif besiyeri hazırlanır, standart yöntemle devam edilir. *LST+MUG broth* ve *LMX broth* besiyerlerinde *E. coli*, laktozdan gaz oluşturması ve floresan ışıma ile belirlenir. Yüksek hacimlerde Durham tüpü kullanmak teknik olarak zordur. Dolayısıyla Durham tüpü kullanılmasına gerek olmayan *LMX broth* uygun bir besiyeridir. Standart yöntemle yapılan analizi sonunda besiyeri renginin mavi-yeşil olması koliform grup bakteri varlığına işaret eder ve devamında uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışıma görülürse analiz edilen numunede *E. coli* varlığı belirlenir. İstenirse VRBL+MUG agara sürme yapılarak doğrulama yapılabilir. Numunede hasar görmüş koliformlar olduğundan endişe ediliyorsa *tamponlanmış peptonlu suda* selektif olmayan ön zenginleştirme ile analize başlanıp, ardından içinde Durham tüpü bulunan 10 mL *LST+MUG broth* ile devam edilebilir.

Su numunesinde *E. coli* varlığı basitçe *Readycult Coliforms* ile analiz edilebilir. Analiz 14.06.04. Bölümde verildiği şekilde başlar. İnkübasyondan sonra besiyeri renginin mavi-yeşil olması koliform grup bakteri varlığına işaret eder ve devamında loş bir ortamda uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışıma görülürse analiz edilen numunede *E. coli* varlığı belirlenir.

İstenirse VRBL+MUG agara sürme yapılarak doğrulama yapılabilir. Readycult, triptofan içerdiği için floresan ışıma görülen erlende istenirse indol testi de yapılabilir.

14.09. *E. coli* O157 Serotipi

Enteropatojenik *E. coli* serotipleri hakkında 09.10. bölümde bilgi verilmiştir. Bu grubun içinde en önemli patojen *E. coli* O157:H7 serotipidir. Daha önceki standart analizlerde, izole edilen tipik koloninin H7 olup olmadığı serolojik yöntemlerle araştırılırken günümüzde sadece O157 serotipi yeterli olmaktadır.

2011 yılı bahar aylarında Almanya'da ortaya çıkan salgına *E. coli* O104:H4 serotipi neden olmuştur. Bu serotip, sorbitol pozitif olduğu için *E. coli* O157:H7 analizinde kullanılan *CT-SMAC agarda* kırmızı renkli koloni oluşturur ve dolayısıyla tipik bir koliform kolonisi olarak değerlendirilir. *E. coli* O104:H4 serotipi beta-glucuronidase pozitiftir ve dolayısıyla standart analizde *E. coli* biyotip 1 gibi sonuç verir.

14.09.01. *E. coli* O157 Standart Analizi

E. coli O157 analizi var/yok testi ile yapılır. Bu amaçla 25 g(mL) gıda numunesi 225 mL *mTSB+novobiocin* besiyerinde[9] 37 ºC'ta 24 saat inkübe edilir ve bu süre sonunda *CT-SMAC agar* besiyerine sürme yapılır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olduğu için renksiz koloniler oluştururken bu besiyerinde gelişebilen sorbitol pozitif bakteriler kırmızı renkli koloniler oluşturur. Nadir de olsa sorbitol pozitif olan suşları renkli koloni oluşturdukları için CT-SMAC agarda belirlenemez. Bu serotipin indol negatif suşlarına da rastlanmıştır.

CT-SMAC agardan izole edilen tipik kolonilerin *E. coli* O157 olup olmadığı serolojik yöntemlerle belirlenmelidir.

14.09.02. *E. coli* O157 Hızlı Analiz

mTSB besiyerinde standart zenginleştirmeden sonra immünokromatografik yöntemle analiz edilen gıda numunesinde *E. coli* O157 serotipi olup olmadığı 35-40 dk içinde belirlenebilir. Bu bölümde *Singlepath E. coli O157 test kiti* ile yapılan analiz verilmiştir (bknz⇒ Ek A08). Başka markalar benzer kitler de vardır. Zenginleştirme sonrası *mTSB'dan* cam bir tüpe 1-2 mL kadar alınıp kaynar su banyosunda 15 dk tutulur ve oda sıcaklığına soğutulur. Sonra kitin örnek aktarma bölgesine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir, 20 dakika beklenip sonuç kontrol edilir. Kitin "C" (kontrol) penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. "T" (test) penceresinde kırmızı şerit meydana gelmiş olması, test

[9] Bazı ticari firma (Merck) ürünü mTSB besiyerine novobiosin eklenmiştir, ayrıca ilave edilmesine gerek yoktur. Bazı markalarda ise bazal besiyerinde novobiosin yoktur, otoklav sonrası katkı olarak eklenir.

edilen kültürde dolayısıyla test edilen gıdada *E. coli* O157 serotipi olduğunu gösterir.

CT-SMAC agarda gelişmiş tipik koloninin tanımlanması için de Singlepath E. coli O157 test kiti kullanılabilir. Bu amaçla CT-SMAC agarda gelişmiş tipik koloni cam tüpteki 1-2 mL saf suda çözülüp kaynar su banyosunda 15 dk tutulur ve oda sıcaklığına soğutulur. Sonra kitin örnek aktarma bölgesine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir, 20 dakika beklenip sonuç kontrol edilir. Kitin "C" (kontrol) penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. "T" (test) penceresinde kırmızı şerit meydana gelmiş olması, test edilen kültürde dolayısıyla test edilen gıdada *E. coli* O157 serotipi varlığını gösterir. İstenirse birden fazla koloni de aynı tüp içinde çözülerek analiz yapılabilir. Sonucun pozitif çıkması analiz edilen kolonilerden en az birinin *E. coli* O157 serotipi olduğunu gösterir.

14.09.03. Verotoksin Analizi

Patojenik tüm *E. coli* serotipleri içinde verotoksin (shigatoksin) oluşturanlar patojenitesi en yüksek olanlardır. Bunlar VT1 ve VT2 olarak adlandırılan iki verotoksinden biri ya da her ikisini de üretirler. Serotipin ne olduğunun analizi yerine doğrudan verotoksin oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi halk sağlığı açısından çok daha önemlidir. Verotoksin analizi Duopath STEC kiti ya da başka analitik yöntemlerle yapılabilir.

14.10. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. hakkında 09.11. bölümde bilgi verilmiştir. Standart var/yok analizi ile 25 g(mL) gıda numunesinde analiz edilir.

14.10.01. *Salmonella*; Var/yok analizi

ISO 6579 numaralı standarda göre *Salmonella* spp. analizi selektif olmayan *tamponlanmış peptonlu su (TPS; buffered pepton water)* besiyerinde ön zenginleştirme ile başlar. Bu aşamada amaç, hasar görmüş olması muhtemel olan *Salmonella* spp. suşlarının hasarlarını onarması ve aktif hale geçmesidir. 34-38 ^{o}C'ta 18±2 saat[10] inkübasyon sonrasında selektif zenginleştirme aşamasına geçilir. Selektif zenginleştirmede ön zenginleştirme kültüründen 2 farklı sıvı selektif besiyerine inokülasyon yapılır. Bu aşamada iki farklı selektif sıvı besiyeri ile devam edilmesinin temel nedeni, farklı serotiplerin selektif inhibitörlerin bileşimleri ve miktarları açısından farklı besiyerlerinde gelişme potansiyelidir. Selektif zenginleştirme aşamasında kullanılan besiyerleri *Rappaport Vassiliadis soy (RVS) broth* ve *Muller-Kauffmann tetrathionate*

[10] *Salmonella* analizinde ön zenginleştirme işlemi 18 saat sürer. Bu süreden daha uzun inkübasyonda sahte negatif sonuç alma olasılığı vardır.

novobiocin (MKTTn) brothtur. Bunlardan *MKTTn*, bazal besiyeridir ve hazırlanması sırasında iyot çözeltileri eklenir.

Selektif zenginleştirme aşamasında RVS broth yerine *modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium* da[11] kullanılabilir. Bu besiyeri de bazal niteliktedir ve kaynatılarak sterilizasyon sonrası novobiocin katkısı ilave edilerek kullanılır.

Selektif zenginleştirme aşamasında *TPS* kültüründen 0,1 mL alınıp 10 mL *RVS broth* ya da *MSRV mediuma* aşılama yapılır. İnkübasyon 41,5±1 ºC'ta 24±3 saat sürer. *MKTTn broth* için 10 mL besiyerine *TPS* kültüründen 1 mL aşılanır. İnkübasyon 37±1 ºC'ta 24±3 saattir.

Selektif zenginleştirme aşamasını koloni izolasyonu amacıyla selektif katı besiyerine sürme aşaması izler. Bu amaçla 2 selektif katı besiyeri kullanılır. Bunlardan biri *XLD agar* olup diğeri kullanıcı tercihine bırakılmış olan *Salmonella* spp. için selektif bir katı besiyeridir. ISO 6579-1:2017 numaralı standartta bu amaca yönelik farklı selektif katı besiyerleri örnekleri bulunmaktadır.

Selektif zenginleştirme amacıyla *MSRV medium* kullanılıyorsa TPS kültüründen yeterince kurutulmuş besiyeri üzerine birbirinden olabildiğince makul eşit uzaklıkta ve inkübasyon sonunda gelişen tipik koloninin kolaylıkla izole edilebileceği şekilde 3 damla damlatılır. Damlaların toplam hacmi 0,1 mL'yi geçmemelidir. İnkübasyon sonunda yarı katı besiyerinde *Salmonella* suşlarının hareketli olması nedeniyle gri beyaz renkli ve opak zonlu koloniler muhtemel *Salmonella* spp. olarak izole edilir. Yöntem, Ek A09'da şematik olarak verilmiştir.

Salmonella analizinde *MSRV* kullanılması analiz süresine 1 gün kazandırır. Uygulamanın esası, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine ekim aşamalarının birleştirilmesi ve *Salmonella* serotiplerinin hareketli olmasıdır. Hareketsiz olan *Salmonella* Gallinarum ve *Salmonella* Pullorum serotipleri bu yöntemle belirlenemez, ancak bu serotipler insan patojeni olmadıkları için bu durum önemli değildir. Selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine ekim aşamamalarının birleştirildiği ticari kitler de vardır.

14.10.02. *Salmonella* Hızlı Analizi

RVS broth besiyerinde standart zenginleştirmeden sonra immünokromatografik yöntemle analiz edilen gıda numunesinde *Salmonella* olup olmadığı 35-40 dk içinde belirlenebilir. Bu bölümde *Singlepath Salmonella test kiti* ile yapılan analiz verilmiştir (bknz⇒ Ek A10). Başka markalarda benzer kitler de vardır.

Zenginleştirme sonrası *RVS* kültüründen uygun (polipropilen) bir tüpe 1-2 mL kadar alınıp kaynar su banyosunda 15 dk tutulur ve oda sıcaklığına soğutulur. Sonra kitin örnek aktarma bölgesine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir, 20 dakika beklenip sonuç kontrol edilir. Kitin "C" (kontrol) penceresinde kırmızı

[11] Yarı katı agar formunda olan bu besiyeri bazı markalarda MSRV agar olarak anılır.

şerit oluşmalıdır. "T" (test) penceresinde kırmızı şerit meydana gelmiş olması test edilen kültürde dolayısıyla test edilen gıdada *Salmonella* spp. olduğunu gösterir.

Selektif katı besiyerinde gelişmiş tipik koloninin tanımlanması için de Singlepath Salmonella test kiti kullanılabilir. Bu amaçla selektif katı besiyerinde gelişmiş tipik koloni cam ya da polipropilen tüpteki 1-2 mL damıtık suda çözülüp kaynar su banyosunda 15 dk tutulur ve oda sıcaklığına soğutulur. Sonra kitin örnek aktarma bölgesine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir, 20 dakika beklenip sonuç kontrol edilir. Kitin "C" (kontrol) penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. "T" (test) penceresinde kırmızı şerit meydana gelmiş olması, test edilen kültürde dolayısıyla test edilen gıdada *Salmonella* spp. varlığını gösterir. İstenirse birden fazla koloni de aynı tüp içinde çözülerek analiz yapılabilir. Sonucun pozitif çıkması analiz edilen kolonilerden en az birinin *Salmonella* spp. olduğunu gösterir.

14.10.03. Biyokimyasal ve Serolojik Testlerle *Salmonella* Doğrulanması

Her ne kadar günümüzde selektif katı besiyerinden izole edilen tipik koloninin *Salmonella* olup olmadığını belirleyen hızlı analiz sistemleri yaygın olarak kullanılsa da bu bölümde uluslararası standartlarda hâlen geçerli olan biyokimyasal analizlere değinilmiştir.

Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testleri

Sadece *Salmonella* spp.'ye özgü olan *TSI agar* testleri 06.04.03.16. bölümde verilmiştir. Yatık agar olarak tüpte hazırlanan bu besiyerine tipik koloniden aşı özesi ile yüzeye sürme ve aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılıp 37 °C'ta 24 saat inkübasyon sonrası *TSI agar* tüpleri incelenir. Tüp yüzeyinin kırmızı olması (besiyerinin orijinal rengi), dipte siyahlık ve tüpte gaz delikleri ya da gaz yarıkları olması *Salmonella* için pozitif sonuçtur. Tüpün dibi sarı renkli olması beklenir, ancak çok büyük çoğunlukla dipteki siyah renk, sarı rengi baskılar. Gaz delikleri her zaman kolaylıkla gözlemlenemeyebilir. Yatık yüzeyin rengi sarı ise izolat *Salmonella* değildir, çünkü *Salmonella* laktoz ve sakkaroz negatiftir. TSI agarda yüzey sarı ise laktoz ve/veya sakkaroz pozitif bir bakteri tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Lysine Iron Agar Testleri

06.04.03.13. bölümde verilen "Dekarboksilaz ve Dihidrolaz Testleri" içindeki lisin dekarboksilaz testi, *Salmonella* için tipik pozitif sonuç verir. Bu amaçla *lysine iron agar* kullanılabilir. Bu besiyerinde dipte siyahlık oluşması da *Salmonella* için pozitif sonuçtur.

Urea Broth Testi

Üre testi olarak da bilinen urease enzimi varlığı testi de *Salmonella* için tipiktir ve tüm serotipler bu testte negatif sonuç verir. Testin detayı 06.04.03.17. bölümde verilmiştir. *Urea broth* kullanılarak yapılır.

Serolojik Doğrulama ve Serotiplendirme

Salmonella için selektif bir besiyerinde tipik morfolojideki kolonilerin biyokimyasal testlerle doğrulanması yeterli değildir. İzolat, serolojik yöntemlerle doğrulanmalı, gerekirse serotiplendirme yapılmalıdır. ISO/TR 6579-3:2014 numaralı standartta bu konuda gereken ayrıntı verilmiştir. Serolojik analizler konu üzerinde uzmanlaşmış laboratuvarlarda yapılabilir.

14.11. *Clostridium botulinum*

Cl. botulinum ve botulin nörotoksinleri hakkında 09.12 bölümde bilgi verilmiştir. Şüpheli bir gıda numunesinde bu bakterinin aranması yerine genellikle fare testleri ile toksin belirlenmesi halen en yaygın uygulamalardan birisidir. Nörotoksinin belirlenmesi için Amplified ELISA, electrochemiluminescence assay, enhanced chemiluminescence based immunoassay formats, endopeptidase activity based Endopep-MS ve Endopep-ELISA yöntemleri "hızlı ve yüksek duyarlıkta" olarak tanımlanmaktadır.

Fare testleri, standart gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında değil bu konuda yetkin laboratuvarlarda yapılır.

Gıdalarda ya da klinik numunelerde *Cl. botulinum* belirlenmesine yönelik selektif besiyerleri yoktur. Sadece analiz edilen numunede genel anaerop bakteri katı besiyerinde anaerop koşulda 28 ve 37 °C'ta yapılan inkübasyonlarda hiçbir koloni gelişmesi olmazsa "*Cl. botulinum* da yoktur" şeklinde bir yorum yapılabilir. Anaerop koloni gelişmesi olursa izole edilen bakterinin genetik yöntemlerle *Cl. botulinum* olarak belirlenmesi de önemli olmayacaktır, çünkü bakteri her koşulda botulinum nörotoksini oluşturamaz.

14.12. *Clostridium perfringens* ve Sülfit İndirgeyen Anaeroplar

Cl. perfringens hakkında 09.13. bölümde bilgi verilmiştir. Gıda mikrobiyolojisi açısından sülfit indirgeyen anaeropların çok büyük çoğunluğu *Cl. perfringens* olmakla beraber çeşitli uluslararası standartlarda bu iki grubun analizi için farklı yöntemler göstermektedir.

14.12.01. *Cl. perfringens*

Cl. perfringens sporlu bir bakteri olmakla birlikte vejetatif hücreleri düşük sıcaklıklara çok duyarlıdır. Bu nedenle *Cl. perfringens* analizinde gıda numunesi

10-15 °C arasında tutularak olanaklar ölçüsünde laboratuvara gönderilmeli ve hızla analize alınmalıdır. Gıda numunesinin analizi 8 saatten sonra yapılabilecek ise steril numune torbasında tamponlanmış steril gliserin tuz çözeltisinde[12] 1:1 olacak şekilde homojenize edilip hızla kuru buz eşliğinde laboratuvara gönderilir ve yaklaşık -60 °C'a korunur. Her ne kadar *Cl. perfringens*, aerotolerant anaerop bakteri olsa da homojenizasyon sırasında hava ile fazlaca temas etmemelidir.

Cl. perfringens analizinde kullanılan besiyeri *tryptose sulfite cycloserine (TSC)* agardır. *TSC agar*, bazal bir besiyeri olup otoklav sonrası 0,4 g/L olacak şekilde D-cycloserine katkısı ile birlikte kullanılır. İstenirse 4-Methylumbelliferyl phosphate (MUP) ilaveli *D-cycloserine* katkısı da bazal besiyerine otoklav sonrası eklenebilir.

D-sikloserin refakatçi florayı baskılarken aynı zamanda *Cl. perfringens* kolonilerinin yayılmasını da kısmen baskılar. Yayma yöntemi ile ekimi yapılan koloniler 37±1 °C'ta 22±2 saat süre ile anaerop ortamda inkübe edilir. Bu süre sonunda *Cl. perfringens* kolonileri, sülfit indirgemeye bağlı olarak gri siyah renk alır. Ancak anaerop kavanozdan çıkarılan Petri kutularındaki *Cl. perfringens* kolonilerindeki siyahlık zamanla azalabilir. Dolayısıyla sayımın 30 dk içinde yapılması önerilir.

Bazal besiyeri katkısı olarak kullanılan 4-Methylumbelliferyl phosphate (MUP), alkali ve asit fosfataz için florojenik bir bileşiktir. Asit fosfataz *Cl. perfringens* için yüksek düzeyde spesifik olup MUP'u uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışıma veren 4-methylumbelliferone'a parçalar ve böylece *Cl. perfringens* kolaylıkla belirlenir. MUP katkısı kullanıldığında dökme kültür yöntemi ile ekim yapılması, inkübasyonun anaerop koşullarda 44±4 °C'ta ve 22±2 saat sürmesi önerilmektedir.

TSC agar, FDA BAM yönergelerine göre yumurta sarısı ilavesi ile kullanılabilir.

14.12.02. Sülfit İndirgeyen Anaeroplar

Temel olarak *sulfite iron agar (base)* kullanılarak gıda numunesinde sülfit indirgeyen anaeroplar analiz edilir. Bazal besiyerine otoklav sonrası 1,4 g/L iron (II) sulfate ilave edilmelidir.

Analiz öncesi istenirse ılımlı bir pastörizasyonla vejetatif hücreler elimine edilebilir. Pastörizasyon için 80 °C'ta 1 dk ya da 75 °C'ta 20 dk gibi uygulamalar önerilmektedir. Analiz raporuna pastörizasyon sıcaklığı ve süresi kaydedilmelidir. Eğer ekim öncesi pastörizasyon uygulanırsa analiz sonucu "anaerop sülfit indirgeyen spor sayısı" olarak verilir.

[12] Steril tamponlanmış gliserin tuz çözeltisi için 4,2 g NaCl 900 mL damıtık su içinde çözülür, 100 mL gliserin ile 12,4 g susuz K_2HPO_4 ve 4,0 g susuz KH_2PO4 eklenip otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. pH 7,2 olmalıdır. Çift kuvvet gliserin çözeltisi için 200 mL gliserin ve 800 mL damıtık su kullanılır.

Diğer çoğu besiyerinden farklı olarak bu besiyeri istenirse tüpte de hazırlanabilir, ancak tüpte kolonilerin sayılması Petri kutusuna kıyasla oldukça zordur. Ekimin tüpte yapılmasının asıl nedeni anaerop koşulun daha iyi sağlanmasıdır. Yeterli kalitede anaerop ortam sağlayan kitlerin ve kavanozların kullanılması ile tüpte ekime gerek kalmaz. Ekim, tüpte yapılırsa anaerobik ortam sağlayan kit ve kavanoza gerek yoktur, ekimden sonra tüp üzerine erimiş halde 40-45 ^{o}C'ta tutulan aynı besiyerinden 2-3 mL eklenmelidir.

Standart analizde beklenen sayıya göre sıvı gıda numunesinin kendisinden ya da katı gıdanın homojenizatından veya uygun seyreltilerden dökme kültür yöntemi ile ekim yapılır. Numunenin Petri kutusuna aktarılmasından en geç 15 dk sonra üzerine erimiş halde 40-45 ^{o}C'ta tutulan *sulfite iron agar* besiyeri dökülüp karıştırılır, jelleşme olduktan sonra aynı besiyerinden 5-10 mL daha ilave edilip bu 2. katın jelleşmesinden sonra Petri kutuları anaerobik ortamda inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon standart olarak anaerop koşulda 37±1 ^{o}C'ta 24-48 saat olarak yapılır. Eğer numunede sülfit indirgeyen termofilik anaeropların varlığı ya da sayısı belirlenmek isteniyorsa bu kez inkübasyon 50±1 ^{o}C'ta yapılır.

İnkübasyonun 24. saatinde Petri kutuları, kolonilerin siyah rengi açısından kontrol edilir. Eğer koloniler yeteri kadar siyah değilse inkübasyona 24 saat daha devam edilir. Siyah renkli ve muhtemelen siyah zonlu koloniler sülfit indirgeyen anaerop bakteri olarak değerlendirilir.

Bazen özellikle Petri kutusu yerine tüpte ekim yapıldığında, besiyerinde tipik olmayan yayılıcı siyahlaşma görülebilir. Bu durum, H_2S yerine sadece hidrojen oluşturarak besiyerinde genel bir siyahlaşmaya neden olan anaeropların varlığında görülür.

Sülfit indirgeyen anaeroplar, H_2S pozitif bakterilerdir ve besiyeri bileşimindeki sülfiti sülfüre indirgerler. Oluşan demir sülfür, kolonilerin siyah renkli olmasını sağlar. H_2S zayıf pozitif olan bakterilerde ise kahverengi koloni oluşur.

14.13. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes hakkında 09.14. bölümde bilgi verilmiştir. Standart analiz yöntemi 25 g(mL) gıda numunesinde var/yok testi olmakla birlikte AB ve başka ülkelerin gıda kodekslerinde belirli sayıların altında olmak kaydı ile *L. monocytogenes* varlığına izin verilmektedir. Buna göre gıda numunelerinde bu bakteri var/yok analizi ile değil doğrudan kültürel sayım yöntemleri kullanılarak analiz edilir. Bu bölümde *L. monocytogenes* için sadece var/yok analiz yöntemi verilmiştir.

14.13.01. *L. monocytogenes* Var/yok Analizi

Analiz, yarı selektif zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine sürme şeklinde yapılır. Uygulama yöntemi Ek A11'de şematik olarak verilmiştir. Analiz, 1/2 (yarım kuvvet) *Fraser broth*[13] besiyerinde yarı selektif zenginleştirme ile başlar. 25 g(mL) gıda numunesi 225 mL 1/2 *Fraser broth* besiyerinde homojenize edilerek 28-30 °C'ta 24-26 saat inkübasyona bırakılır. Numunede önemli ölçüde hasar görmüş *L. monocytogenes* varlığından endişe ediliyorsa *Fraser broth*, katkıları eklenmeden 4 saat inkübe edilip sonra katkılar eklenebilir. Bu koşulda da toplam inkübasyon süresi 24-26 saattir ve canlandırma yapılırsa analiz raporunda belirtilmelidir. Bu sürenin sonunda yarı selektif zenginleştirme kültüründen (1/2 Fraser broth);

-10 mL tam kuvvette (1/1) Fraser brotha 0,1 mL ekim yapılıp 36-38 °C'ta 24-26 saat inkübasyona bırakılır.

-Paralel olarak *Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti*[14] ile kullanıcının tercihine bırakılmış olan ikinci bir *Listeria* selektif katı besiyerine[15] sürme yapılır. Petri kutuları 36-38 °C'ta 24-26 saat inkübasyona bırakılır.

Devamında tam kuvvette *Fraser broth* selektif zenginleştirme kültürünün 24. ve 48. saat inkübasyonundan sonra *Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti* ile kullanıcının tercihine bırakılmış olan ikinci bir *Listeria* selektif katı besiyerine sürme yapılır. Petri kutuları 36-38 °C'ta 24-26 saat inkübasyona bırakılır.

Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti besiyeri bileşiminde kromojenik bileşen olan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside bulunur. Bu substrat, tüm *Listeria* türlerinde bulunan β-glucosidase enzimi aracılığı ile kolonilerin mavi-yeşil renk almasını sağlar. Diğer *Listeria* türlerinden farklı olarak tüm *L. monocytogenes* suşlarında phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) bulunur. Besiyerine katılan özel bir substrat, *L. monocytogenes* tarafından hidrolize edilerek koloni etrafında opak bir hale oluşmasını sağlar. Bazı *L. monocytogenes* suşlarında özellikle asit stresi altında olduklarında zayıf C (PI-PLC) aktivitesine bağlı olarak koloni etrafında zayıf hale oluşabilir. Şüpheli

---

[13] Özellikle EMS yönteminde kullanılan bazı besiyerleri çift kuvvet olarak hazırlanır (bknz⇒ 04.03.04. Özel Uygulamalar bölümü). 1/2 Fraser broth, bunun tersine olarak bazal besiyeri bileşenleri yarım kuvvette hazırlanacak değildir. 1/2 Fraser broth hazırlanırken sadece tam kuvvette Fraser broth selektif katkısı 1/2 derişimde bazal besiyerine ilave edilir. Fraser broth besiyerinin, amonyum demir (III) sitrat ve selektif katkı (akriflavin ve nalidiksik asit) olmak üzere iki katkısı vardır. 1/2 Fraser broth hazırlanırken sadece selektif katkı 1/2 derişimde bazal besiyerine eklenir.

[14] ISO 11290 numaralı standartta bu isimle anılan bu *Listeria* selektif katı besiyeri, farklı ticari markalarda farklı isimlerle pazarlanır (örneğin ALOA vb.).

[15] Bu amaçla en çok tercih edilen *Listeria* selektif katı besiyerleri, *PALCAM agar* ve *Oxford agardır*. Farklı kullanıcılar, bu amaçla farklı *Listeria* selektif katı besiyeri tercih edebilirler.

durumda inkübasyona 24 saat daha devam edilebilir, ancak çoğu *Listeria ivanovii* suşu da 48 saat inkübasyon sonrası opak hale oluşturur.

Toplamda 6 Petri kutusunda görülen tipik koloniler biyokimyasal yöntemlerle, 16S ribozomal analizlerle ya da immunokromatografik yöntemlerle (örneğin *Singlepath Listeria mono*) tanımlanabilir. Bu amaçla değerlendirilen herhangi bir Petri kutusundan elde edilecek herhangi bir izolatın *L. monocytogenes* olarak tanımlanması, analiz edilen numunede *L. monocytogenes* varlığını gösterir.

L. monocytogenes biyokimyasal tanımlanmasında CAMP testi (bknz⇒ 06.04.03.23. CAMP Testi bölümü) ile rhamnose ve xylose kullanımı (bknz⇒ 06.04.03.10. Karbohidrat Testleri bölümü) geçerliğini korumaktadır.

Listeria türlerinin biyokimyasal tanımlamasında çizelge 14.01 kullanılabilir.

Çizelge 14.01. *Listeria* Türlerinin Ayrımı

Tür	Ramnoz	Ksiloz	ß hemoliz	CAMP *S.a.*	CAMP *R.e.*
L. monocytogenes	+	–	+	+	–*
L. innocua	v	–	–	–	–
L. ivanovii	–	+	+	–	+
L. seeligeri	–	+	+	+	–
L. welshimeri	v	+	–	–	–
L. grayi	–	–	–	–	–

*Nadiren pozitif sonuç alınmaktadır. v: değişken; S.a. *S. aureus*; R.e. *R. equi*

Tipik koloniler, CASA agar gibi genel bir agarlı besiyerinde 37 ºC'ta geliştirildikten sonra CAMP testi ile ksiloz ve ramnoz testleri yapılmalıdır.

14.13.02. *L. monocytogenes* Hızlı Analizi

Uygulama yöntemi şematik olarak Ek A12'de verilmiştir. *Singlepath Listeria mono test kiti* kullanıldığında 1/1 *Fraser broth* kültüründen herhangi bir ısıl işleme gerek kalmaksızın doğrudan 150 µL (Pastör pipeti ile 5 serbest damla) test kitinin numune aktarma bölmesine ilave edilir. Başka markalarda kültürün önceden kaynar su banyosunda tutulması gerekebilir. Genellikle 5-10 dk sonra kontrol (C) penceresinde kırmızı şerit görülmelidir. Bu penceredeki kırmızı şerit oluşumu, test kitinin doğru çalıştığını kanıtlar. En geç 30 dk içinde kitin test (T) penceresinde kırmızı şerit olması *L. monocytogenes* varlığını gösterir. Negatif sonuç koşulunda analiz bitmiştir. Pozitif sonuç alınırsa analize standart yöntemlerle devam edilmelidir.

Standart olarak buzdolabında saklanan test kiti, analizden önce oda sıcaklığına getirilip koruyucu folyo açıldıkta 2 saat içinde kullanılmalıdır. İnkübatörden çıkartılan kültür de oda sıcaklığına soğutulup sonra kite aktarılmalıdır.

Selektif bir katı besiyerinde gelişen tipik kolonilerin *L. monocytogenes* olup olmadığını anlamak için şüpheli 1-3 koloni beraberce 250 µL *CASO brotha*

aktarılıp 37 °C'ta 1 saat inkübasyona bırakılır. Oda sıcaklığına soğutulur ve işlem yukarıda verildiği gibi devam eder. Pozitif sonuç, numunede *L. monocytogenes* varlığını gösterir.

14.13.03. *L. monocytogenes* Sayımı

Gıda numunesi standart yöntemlerle homojenize edilir ve 10^{-1} seyreltiden (homojenizat) *Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti* besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılır. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir. 37 °C'ta 24 saat sonra tipik koloniler sayılır, gerekirse inkübasyona 24 saat daha devam edilir. Tipik koloniler genel bir agarlı besiyerinde 37 °C'ta geliştirildikten sonra CAMP testi ile ksiloz ve ramnoz testleri yapılmalıdır.

14.14. *Staphylococcus aureus*

Staph. aureus hakkında 09.15. *Staphylococcus aureus* bölümünde bilgi verilmiştir. Standart analizi, *Baird-Parker agarda* sayım şeklindedir. *Egg yolk tellurite* katkısı eklenmiş besiyerine ekim ve 37 °C'ta 24 saat aerobik inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında, parlak siyah ve koloni etrafında *Staph. aureus* lesitinaz aktivitesine bağlı olarak saydam hale görülen koloniler[16] *Staph. aureus* olarak sayılır, ancak uluslararası kodekslere göre asıl önemli olan koagülaz pozitif olan *Staph. aureus* sayısıdır. Dolayısıyla tipik kolonilere koagülaz testi (bknz⇒ 06.04.03.21. bölüm) uygulanması gereklidir. *Koagülaz testi*, tavşan plazması kullanılarak yapılır. *Baird-Parker agar* besiyerinde *Staph. epidermidis* ve mikrokoklar kolaylıkla gelişir. *Staph. aureus*, bu bakterilerden koagülaz pozitif olması ile ayrılır. Ayrıca koagülaz negatif *Staph. aureus* suşları da vardır, ancak bunlar insan sağlığını ilgilendirmez.

14.14.01. *Staph. aureus*; Standart Analiz

Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre sıvı gıdanın kendisinden ya da katı gıdanın homojenizatından veya seyreltilerinden *Egg yolk tellurite* katkılı *Baird-Parker agara* yayma yöntemiyle ekim yapılır. *Staph. aureus* fakültatif anaerop karakterlidir, ancak koloni morfolojisinin belirgin olması için bakterinin aerop ortamda gelişmesi gereklidir.

Standart yayma yöntemi ile ekimde Petri kutusuna 0,1 mL numune aktarılması yaygın bir uygulama olsa da düşük sayıda *Staph. aureus* beklenen/ hedef alınan numunelerde 1 mL homojenizatın 14 cm çaplı Petri kutusundaki *Baird-Parker*

[16] *Staph. aureus*, lesitinaz aktivitesine bağlı olarak *Baird-Parker agar* besiyerindeki koloni etrafındaki berrak zonlar, her zaman belirgin olmayabilir. İnkübasyon sonrasında Petri kutularının bir gece buzdolabında bekletilmesi ile zonlar daha belirgin hale gelir. Ekim öncesinde *Baird-Parker agar* besiyerinin bir gece buzdolabında bekletilmesi ile de daha berrak zon elde edildiği bildirilmektedir.

agar besiyerine yayılması ya da standart 9 cm çaplı Petri kutularında bulunan 3 adet Baird-Parker agar besiyerine 1 mL homojenizatın olabildiğince eşit şekilde dağıtılıp yayılması mümkündür. Bu uygulama, *Staph. aureus* için ISO 6888-1'de gösterilmiştir.

14.14.02. *Staph. aureus;* Baird-Parker Rabbit Plasma Besiyeri

Egg yolk tellurite katkılı *Baird-Parker agar* besiyerinde gelişen tipik kolonilerin koagülaz pozitif olup olmadıklarının belirlenmesi için bu kolonilerin brain heart brothta 37 °C'ta 24 saat inkübe edilmesi ve inkübasyondan sonra bu kültürde koagülaz testi yapılması gereklidir. Buna göre analiz, 24 saat + koagülaz test sonucu kadar daha uzar.

Alternatif olarak Baird-Parker agar besiyerine egg yolk tellurite katkısı yerine tavşan plazması + tellurite katkısı olan besiyerine ekim ve 24 saat inkübasyon sonrası 1-2 mm çaplı ve parlak siyah renkli kolonilerin etrafında renksiz zonlu koloniler, doğrudan koagülaz pozitif *Staph. aureus* olarak değerlendirilir. Böylece katkı olarak egg yolk tellurite kullanılan Baird-Parker agar besiyerine kıyasla analiz süresinde 24 saat + koagülaz test sonucu kadar zaman tasarrufu sağlanmış olur.

Doğal olarak rabbit plasma + tellurite katkısının fiyatı, egg yolk tellurite katkısı fiyatından daha yüksektir. Gıda işletmesinin hangi katkıyı tercih edeceği, piyasaya verilen son üründeki muhtemel koagülaz *Staph. aureus* varlığı ile doğrudan ilişkilidir ve her işletme stok maliyetlerini de dikkate alarak rabbit plasma + tellurite ya da egg yolk tellurite katkılı Baird-Parker agar tercih eder.

-Son üründe zaten *Staph. aureus* hiç çıkmıyorsa ya da çok nadir ise ve stok maliyetleri önemli değilse egg yolk tellurite katkılı Baird-Parker agar tercih edilebilir.

-Son üründe ara sıra *Staph. aureus* çıkıyorsa ve stok maliyetleri önemli ise rabbit plasma + tellurite katkılı Baird-Parker agar tercih edilebilir.

14.14.03. *Staph. aureus;* EMS Yöntemi

Gıda numunesinde düşük sayılarda *Staph. aureus* varlığında ya da hedeflendiğinde standart EMS yöntemi ile sayım yapılabilir. Bu amaçla *Giolitti-Cantoni broth* kullanılır. Analiz, standart EMS yöntemi (bknz⇒ 08.02. bölüm) ile yapılır. Bu besiyerinin hazırlanmasında bazal besiyeri tüplerde sterilize edilir, üzerine filtre ile edilmiş potasyum tellurite çözeltisi eklenir. Kimi standartlarda besiyerinin 20x200 mL tüplerde 19 mL olarak hazırlanmasına işaret edilir. 19 mL olarak hazırlanan tüplerin pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmesinde EMS açısından bir fark yoktur, standart EMS çizelgelerinden okuma yapılır.

Tüplerin ekimi tamamlandıktan sonra tüplerin üzerine 2-3 mL steril sıvı parafin ya da %1 su agar eklenerek anaerop bir ortam sağlanır. İnkübasyon, anaerop kavanozda yapılacaksa tüplerin üzerinin parafin ya da su agar ile örtülmesine gerek yoktur. 37 °C'ta 24-48 saat süren inkübasyondan sonra *Giolitti-Cantoni*

broth tüplerinde kararma olması muhtemel pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Bu tüplerin her birinden *Baird-Parker agara* sürme yapılarak standart yöntemle devam edilerek numunedeki koagülaz pozitif *Staph. aureus* sayısı hesaplanır.

BAM AOAC, EMS yöntemi ile *Staph. aureus* sayımında besiyeri olarak %10 NaCl ve %1 sodyum piruvat içeren *tryptic soy (CASO) broth* göstermiştir. Buna göre inkübasyon sonunda bulanıklık görülen tüplerden yine *Baird-Parker agara* sürme yapılarak devam edilir.

14.15. *Campylobacter jejuni*

Camp. jejuni hakkında 09.16. bölümde bilgi verilmiştir. Kayıtlara geçmiş şekli ile gıda kaynaklı hastalıklara en fazla sayıda neden olan patojendir. Olumsuz çevresel faktörlere çok duyarlı olmasına rağmen enfektif dozunun düşük olması nedeni ile orta ya da şiddetli ishale yol açar.

Gıda, klinik ve çevresel numunelerde *Campylobacter* spp. analizi, üç ayrı koşul değerlendirilerek yapılır:

-Düşük sayıda *Campylobacter* spp. ve düşük sayıda refakatçi flora varlığı ve/veya stres altında olduğu düşünülen *Campylobacter* spp. varlığında zenginleştirme yapılır. Bu koşulda numune *Bolton broth* besiyerinde önce 37 ^{o}C'ta 4-6 saat süreli canlandırma ve devamında 41,5±1 ^{o}C'ta toplam inkübasyon süresi 48 saat olacak şekilde, mikroaerofilik ortamda inkübasyon ve son olarak *modified charcoal cefoperozone deoxycholate (mCCD) agar* ile selektivitesi farklı prensiplerle sağlanmış ikinci bir selektifi katı besiyerine sürme yapılır.

-Düşük sayıda *Campylobacter* spp. ve yüksek sayıda refakatçi flora varlığında analiz, yine zenginleştirme ile başlar. Bu amaçla Preston brothta mikroaerofilik ortamda ve 41,5±1 ^{o}C'ta 24 saat zenginleştirme ve ardından *mCCD agara* sürme ile tamamlanır.

-Yüksek sayıda *Campylobacter* spp. varlığında doğrudan *mCCD agara* ekim yapılır.

Gıda mikrobiyolojisi açısından günlük *Campylobacter* spp. analizinde en yaygın uygulama, 25 g(mL) numunenin 225 mL *Bolton broth* besiyerinde önce 37 ^{o}C'ta 4-6 saat süreli canlandırma ve devamında 41,5±1 ^{o}C'ta toplam inkübasyon süresi 48 saat olacak şekilde mikroaerofilik ortamda zenginleştirme ve ardından bu kültürden *mCCD agara* ekimdir. *mCCD agar* da yine 41,5±1 ^{o}C'ta mikroaerofilik ortamda 44-48 saat inkübe edilir.

İnkübasyonda anaerobik ortam sağlayan kitler değil mikroaerofilik atmosfer sağlayan (örneğin *Anaerocult C*) kitler kullanılmalıdır. Tipik bir mikroaerofil karakterde olan *Camp. jejuni*, gelişmesi için %8-10 CO_2 ve %5-7 O_2'e gerek duyar. *Camp. jejuni*, anaerop inkübasyonda gelişemez.

Gerek *Bolton broth* gerek *mCCD agar* bazal besiyeridir. Otoklav sonrası selektif katkıların (sırası ile *Bolton Broth Selective Supplement acc. ISO 10272* ve *CCDA Selective Supplement*) eklenmesi ile kullanıma hazır hale gelir.

Çeşitli uluslararası standartlarda *Campylobacter* spp.'nin donma sıcaklıklarına çok duyarlı olduğu, ancak düşük sıcaklıklarda canlığını koruduğunu ve buna bağlı olarak analiz edilecek gıda numunesinin dondurulmaması, olabildiğince hızlı şekilde analize alınması, ancak analiz öncesi depolama zorunlu ise 3 °C'ta depolanabileceği uyarısı vardır.

mCCD agarda gelişen tipik *Campylobacter* kolonileri düz, nemli, grimsi renkte ve genellikle metalik bir parlaklık veren görünümündedir. Bu besiyerinde gelişen tipik koloninin asıl olarak *Camp. jejuni* olup olmadığı hippurat testi ile belirlenebilir. *Camp. jejuni* hippurat pozitiftir. Ayrıca PCR, serolojik yöntemler, (MALDI-TOF-MS) analizleri vb. ile de tanımlama yapılabilir. *Singlepath Campylobacter* kiti kullanılarak da koloninin *Campylobacter* spp. olup olmadığı kontrol edilebilir (bknz⇒ Ek A13).

14.16. *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus hakkında 09.17. bölümde bilgi verilmiştir. Halofilik karakterli olması nedeni ile analizinde kullanılan besiyerlerinde NaCl derişimi önemlidir. Standart analiz yönteminde 25 g(mL) gıda numunesinde var/yok testi ile analiz edilir.

Gıdaların *V. parahaemolyticus* açısından analizi sırasında *V. vulnificus* ve çok daha önemli bir patojen olan *V. cholerae* da standart analizde kullanılan selektif katı besiyerinde gelişerek koloni oluşturabilir. Dolayısı ile *V. parahaemolyticus* analizinin uzman bir mikrobiyolog tarafından yapılması ve analizde kullanılan tüm materyalin analiz sonrasında tam olarak sterilize edilmesi önemlidir.

Analiz, standart olarak 25 g(mL) numunenin 225 mL *alkaline saline peptone water (ASPW)* besiyerinde zenginleştirme ile başlar. İnkübasyon süresi 6±1 saattir. Numunenin özelliğine göre inkübasyon sıcaklığı 41,5±1 °C ya da 37±1 °C olarak uygulanır. İnkübasyon sıcaklığı ve diğer ayrıntılar için ISO 21872 numaralı standarda başvurulmalıdır. BAM AOAC kaynağında da yeterli teknik ayrıntı bulunmaktadır.

ISO 21872 numaralı standarda göre *ASPW*'de yapılan zenginleştirme sonrasında yine *ASPW*'de ikinci zenginleştirme önerilmektedir. Bu amaçla 10 mL *ASPW* besiyerine 1 mL ilk zenginleştirme kültürü aşılanır ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sıcaklığı yine hedef bakteri ve ürün özelliğine göre değişir. İkinci zenginleştirmeden sonra *thiosulfate citrate bile and sucrose (TCBS) agar* ve laboratuvar tarafından seçilecek ikinci bir selektif besiyerine sürme yapılır. *TCBS agarda* inkübasyon 37±1 °C'ta 24±3 saat sürer. Bu sürenin sonunda *TCBS agarda V. parahaemolyticus* yuvarlak 2-3 mm çapında opak yeşil ya da mavimsi koloni oluşturur. Kolonilerin biyokimyasal yöntemlerle ya da PCR veya

real-time PCR ile tanımlanması gerekir. Biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması NaCl (30,0 g/L) ilave edilmiş yatık *TSI agar* besiyerine standart şekilde daldırma ve yüzeye sürme şeklinde ekim yapılır. 35-37 ºC'ta 24 saat inkübasyondan sonra *V. parahaemolyticus* reaksiyonu yüzey kırmızı (laktoz ve sakkaroz negatif), dip sarı (glikoz pozitif, H_2S negatif), gaz yarıkları yok (glikozdan gaz oluşturma negatif) şeklindedir. *V. parahaemolyticus* indol pozitif bir bakteridir. İndol testi için NaCl (25,0 g/L) ilave edilmiş *tryptone water* besiyerine inokülasyon ve 35-37 ºC'ta 24 saat inkübasyon ve ardından indol testi yapılır. Ayrıca ONPG negatiftir (bknz⇒ 06.04.03.18. β-Galactosidase ONPG Testi bölümü) ve %10 NaCl'lü peptonlu su ortamında gelişemez. Selektif katı besiyerinden izole edilen tipik koloninin tanımlanması amacıyla ticari biyokimyasal test kitleri de (API, Microbact vb.) kullanılmaktadır.

14.17. *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii*

Cronobacter sakazakii hakkında 09.18. bölümde bilgi verilmiştir. Asıl olarak bebek mamalarında ve mama bileşenlerinde aranır sayılır.

Standart analiz yöntemi selektif olmayan ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif katı besiyerine sürme ve koloninin tanımlanması aşamalarını içerir.

Ön zenginleştirme *TPS* ortamında yapılır. Bu amaçla 10 g(mL) numune 90 mL *TPS* besiyerine aşılanır. Amaca göre 25 g(mL) numune için 225 mL *TPS* kullanılır. 36 ºC'ta 18 saat inkübasyondan sonra buradan alınan 0,1 mL kültür 10 mL *Cronobacter Selective broth (CSB)* besiyerine aşılanır ve 41,5 ºC'ta 24 saat inkübasyona bırakılır.

CSB kültürü standart şekilde *Chromogenic Cronobacter isolation (CCI) agar* besiyerine sürülür. Yine 41,5 ºC'ta 24 saat inkübasyon sonrası tipik koloniler izole edilir. *Cro. sakazakii*, *CCI agarda* 1-3 mm çaplı mavi ya da mavi yeşil koloniler oluşturur. Bunlar biyokimyasal ve/veya PCR yöntemi ile tanımlanır.

14.18. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus hakkında 09.19. bölümde bilgi verilmiştir. Standart analiz yöntemi katı besiyerinde koloni saymaktır. Amaca göre EMS yöntemi ile sayım ya da var/yok testleri de yapılabilir.

Gıdalarda *B. cereus* analizinde kullanılan selektif katı besiyerinde *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis, B. thuringiensis, B. pseudomycoides B. mycoides* de *B. cereus* gibi tipik ya da benzer koloniler verir. Bu kolonilerin standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında *B. cereus* olup olmadıklarının belirlenmesi oldukça zordur. Bununla beraber, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. mycoides*, gıdaların günlük analizinde oldukça nadir olarak ortaya çıkarlar. Bu nedenle tipik

koloniler *B. cereus* olarak kabul edilir, ancak kritik analizlerde koloninin moleküler teknikler ile tanımlanması gerekir.

Sadece *B. cereus* sporlarının analizi isteniyor ise sporlu bakterilerin analizi kurallarına uyularak homojenizat (ya da numune sıvı ise doğrudan numunenin kendisi) 80 °C'ta 5 dk pastörize edilir. Farklı kaynaklar bu süreyi 10 dk. olarak vermektedir. Pastörizasyon sıcaklık ve süresi analiz raporunda belirtilmelidir.

14.18.01. *B. cereus*; Katı Besiyerinde Sayım

Yayma yöntemi ile yapılan standart sayım yöntemidir. Homojenizasyon ve gerekli ise seyreltiler yapıldıktan sonra *mannitol egg yolk polymyxin (MYP) agar* besiyerine ekim yapılır.

Analiz edilen numunede düşük sayıda *B. cereus* bekleniyor ise homojenizattan (ya da sıvı gıda numunesinin kendisinden) 14 cm çaplı Petri kutusunda hazırlanmış *MYP agara* 1 mL numune aktarılabilir ya da standart 3 adet Petri kutusundaki *MYP agar*a 1 mL numune olabildiğince eşit olarak dağıtılabilir.

30 °C'ta aerobik koşullarda 21±3 saat inkübasyondan sonra tipik koloniler sayılır. Eğer koloniler belirgin değilse inkübasyona 24 saat daha devam edilir. *MYP agar* besiyerinde *B. cereus* kolonileri tipik olarak büyük, pembe ve lesitinaz aktivitesine bağlı olarak koloni etrafında presipitasyon zonu oluşturur. *B. cereus*, mannitol negatif bir bakteridir. Buna bağlı olarak kolonileri bu besiyerinde renk değiştirmez ve pembe renkli kalır. Koloni rengi sarı ise bu koloni, mannitol pozitif bir bakteridir ve *B. cereus* değildir. Analiz edilen numunede refakatçi olarak yoğun mannitol pozitif bakteri varsa *B. cereus*'un tipik pembe kolonileri maskelenebilir.

14.18.02. *B. cereus*; EMS Yöntemi ile Sayım

Standart EMS kuralları uygulanır. Bu amaçla kullanılan sıvı besiyeri *tryptic soy (CASO) broth+polymyxin* besiyeridir. 30 °C'ta aerobik koşullarda 21±3 saat inkübasyondan sonra bulanıklık görülen tüplerden *MYP agara* sürme yapılır, yine 30 °C'ta aerobik koşullarda 21±3 saat inkübasyondan sonra tipik/ doğrulanmış kolonilerin elde edildiği tüpler (+) olarak değerlendirilir ve EMS çizelgesinden sonuç hesaplanır (bknz⇒ 08.02. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi bölümü).

14.18.03. *B. cereus*; Var/yok Analizi

Amaca göre gereken miktar gıda numunesi, x9 misli *tryptic soy* (*CASO*) *broth+polymyxin* besiyerinde homojenize edilip 30 °C'ta aerobik koşullarda 21±3 saat inkübasyona bırakılır. Besiyerinde bulanıklık oluşursa *MYP agara* sürme yapılıp standart yöntemle devam edilir.

14.19. *Shigella* spp.

Shigella spp. hakkında 09.20. bölümde bilgi verilmiştir. 25 g(mL) gıda numunesi tartılır ve gerekirse homojenize edilip 225 mL *Shigella broth* besiyerinde anaerobik atmosferde 44 °C'ta 16-20 saat inkübe edilir. Bazı kaynaklar inkübasyon sıcaklığını 41,5±1 °C olarak vermektedir. İnkübasyondan sonra selektif bir katı besiyerine sürme yapılır. Bu amaçla düşük selektiviteli MacConkey agar, orta selektiviteli *XLD agar* ya da yüksek selektiviteli Hektoen enteric agar kullanılabilir. Bu besiyerlerinden hangisi olursa olsun inkübasyon 35-37 °C'ta 22±2 saat süre ile yapılır. BAM AOAC, MacConkey agar önermektedir. İnkübasyon sonunda *Shigella* spp.'nin laktoz negatif olma özelliğine bağlı olarak MacConkey agarda renksiz/ soluk pembe, *XLD agarda* kırmızı merkezli yarı saydam ve Hektoen enteric agarda yeşil ve nemli görünümdeki koloniler, muhtemel *Shigella* spp. olarak izole edilir.

İzolatlar, standart biyokimyasal yöntemlerle ya da serolojik yöntemlerle tanımlanabilir. *Shigella* spp. tipik olarak hareketsiz, H_2S (-), gaz oluşturmayan, lisin dekorboksilasyon (-), laktoz (-) ve sakkaroz (-) reaksiyon verir. Bu testlerden H_2S, gaz, laktoz ve sakkaroz testleri basit olarak TSI agarda izlenebilir.

Her ne kadar *Shigella* spp., laktoz negatif olarak tanımlansa da *Sh. sonnei*, geç laktoz pozitif sonuç verebilir. Bu nedenle özellikle laktoz testi sonucu 24 saatte okunmalıdır.

14.20. *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica hakkında 09.21. bölümde bilgi verilmiştir. Dondurulmuş gıdalardan izole edilebilse de analiz numunesinin dondurulmaması önerilir. Analiz, genellikle 25 g(mL) gıdada var/yok şeklinde yapılır. Bu amaçla 25 g(mL) gıda numunesi 225 mL peptone sorbitol bile (PSB) broth ile homojenize edilir. Bu homojenizattan 10 mL alınıp 90 mL irgasan ticarcillin potassium chlorate (ITC) brotha aşılanır ve ITC broth ile PSB brothun kalan kısmı 25±1 °C'ta 44±4 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra her 2 zenginleştirme besiyerinden 0,5 mL alınıp 4,5 mL KOH çözeltisine[17] aktarılır, 20±5 sn süre ile tüp karıştırıcıda karıştırılıp CIN agara sürme yapılır. Petri kutuları 30±1 °C'ta 24±2 saat inkübe edilir. *Y. enterocolitica* bu besiyerinde 1-2 mm çapında kırmızı renkli saydam zonlu koloniler oluşturur. Tipik koloniler biyokimyasal testlerle ya da moleküler yöntemlerle tanımlanır.

Y. enterocolitica, lisin ve arjinin arjinin dekarboksilasyon (-) negatif, 24±2 °C'ta hareketli fakat 36±1 °C'ta hareketsiz, üre ve mannitol (+) reaksiyon verir.

[17] 100 mL steril %0,9 NaCl çözeltisine 0,5 g KOH eklenerek hazırlanır. Çözelti, kullanılmadan 1 gün önce hazırlanmalıdır.

Analiz edilen numunede yüksek sayıda *Y. enterocolitica* varlığından şüphe ediliyorsa zenginleştirme aşaması atlanıp doğrudan CIN agara 0,1 mL yayma yapılabilir.

14.21. Enterokoklar

Enterokoklar hakkında 09.22. bölümde bilgi verilmiştir. Gıdalara kıyasla içme ve kullanma sularında aranır ya da sayılırlar. Sularda enterokok analizleri çok genel olarak membran filtrasyon yöntemi ile yapılır. 100 mL su numunesinde var/yok analizi de yaygın olarak kullanılır. Genel olarak fekal kontaminasyon göstergesi olsa da başta Türk tipi Beyaz peynir olmak üzere çeşitli peynirlerde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Starter olarak kullanılmadıkları çiğ sütten yapılmış peynirlerde ve gereken hijyene uyulmayan mandıralarda üretilen peynirlerde, sıklıkla fekal bulaşma sonucu bulurlar.

14.21.01. Enterokoklar; Gıda Analizleri

Standart yöntemlerle hazırlanan numune homojenizatından ve/veya seyreltilerinden dökme ya da yayma yöntemi ile *kromojenik enterococci agar* besiyerine ekim yapılır. 35-37 ºC'ta 24±4 saat inkübasyona bırakılan Petri kutularında koloni gelişmesi olmazsa ya da koloniler tipik kırmızı renkte görülmüyorsa inkübasyona 24 saat daha devam edilir.

14.21.02. Enterokoklar; Sularda Membran Filtrasyon Yöntemi

Standart membran filtrasyon yöntemi uygulanır (bknz⇒ 08.03. Bölüm). Amaca uygun hacimde su, membran filtrasyon sisteminden geçirildikten sonra membran filtre *Slanetz and Bartley agar* üzerine yerleştirilir. 36±2 ºC'ta 44±4 saat inkübasyon sonunda enterokoklar, besiyeri bileşiminde bulunan *TTC*'yi (*2,3,5-Triphenyl-tetrazolium chloride*) formazana indirgeyerek kırmızı renkli koloni oluştururlar. Tipik koloniler, merkezde veya kolonin tümünde kırmızı, kestane veya pembe renk gösterir.

14.21.03. Enterokoklar; 100 mL Suda Var/yok Analizi

Su numunesinde enterokokların varlığı basitçe *Readycult Enterococci* ile analiz edilebilir. Bu sistemin özelliği dehidre broth şeklinde hazırlanmış steril preparatın analiz edilecek su numunesine eklenmesi ve inkübasyona bırakılmasıdır. Bir anlamda su numunesi, besiyeri hazırlamak için kullanılacak su yerine geçmektedir. İnkübasyon sıcaklığı 35-37 ºC'ta 24 saattir. Eğer inkübasyon oda sıcaklığında (20-25 ºC) yapılırsa süre 48 saat olmalıdır. İnkübasyondan sonra besiyeri renginin mavi-yeşil olması enterokokların varlığına işaret eder. Numune kabının sadece üst bölümünde mavi-yeşil renk olursa sonuç yine pozitif olarak değerlendirilir.

14.22. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. hakkında 09.23. bölümde bilgi verilmiştir. Bu cins içinde önemli olan tür *Pse. aeruginosa* olup asıl olarak içme ve kullanma sularında membran filtrasyon yöntemiyle analiz edilir. Ayrıca kanatlı etleri ile kırmızı et ve ürünlerinde *Pse. aeruginosa* analizi yapılır. Bu amaçla kullanılan besiyeri *Pseudomonas CFC/CN agardır*. Bazal besiyerine *CN katkısı* ve gliserol eklendiğinde membran filtrasyonla *Pse. aeruginosa*, *CFC katkısı* eklendiğinde etlerde *Pse. aeruginosa* analizi için ISO standartlarına uygun besiyerleri hazırlanmış olur.

CN katkılı Pseudomonas agar besiyeri aerobik ortamda 36±2 ºC'ta 44±4 saat inkübe edilir. Membran filtreler 20±2 saat inkübasyondan sonra koloni gelişmesi açısından kontrol edilir. Et ürünlerinin analizi için CFC katkılı Pseudomonas agar kullanıldığında yayma yöntemi ile ekimi yapılan Petri kutuları aerobik ortamda 25±1 ºC'ta 44±4 saat inkübe edilir.

İnkübasyondan sonra pyocyanin oluşumuna bağlı olarak mavi-yeşil renkli koloniler *Pse. aeruginosa* olarak sayılır. Bunların dışında uzun dalga UV lamba altında floresan ışıma veren ve/veya kırmızımsı kahverengi koloniler muhtemel *Pse. aeruginosa* olarak değerlendirilir ve bunlar *King agar* ve/veya asetamit broth ile doğrulanır.

Özellikle suların analizinde *Pse. fluorescens* sıklıkla *Pse. aeruginosa* benzeri koloni oluşturur. *King agar* ve/veya asetamit broth testleri ile bu 2 bakteri kolaylıkla ayırt edilebilir. Asetamit broth testinde (bknz⇒ 06.04.03.07. Asetamit Testi) *Pse. aeruginosa* pozitif, *Pse. fluorescens* negatif sonuç verir. Daha basit bir test ise 42 ºC'ta gelişme testidir. *CASO broth* gibi genel bir sıvı besiyerinde 24 saat inkübasyon sonunda gelişme olursa izolat *Pse. aeruginosa* olarak değerlendirilir. *Pse. fluorescens* 42 ºC'ta gelişemez.

14.23. Sporlu Bakteriler

Gıdalarda patojen ya da saprofit, aerop ve anaerop sporlu bakterilerin analizinde özel kurallar vardır. Basit olarak analizde önce vejetatif formdaki bakteriler ısıl işlemle imha edilir. Bu aşamada sporlu bakterilerin canlı kaldığı kabul edilir. Sonra uygun besiyerine ekim yapılıp uygun atmosferde ve sıcaklıkta inkübasyona bırakılan Petri kutularında ya da tüplerde inkübasyon sonunda gelişen koloniler değerlendirilerek sayım ya da var/yok analiz sonuçları verilir.

Sporlu bakteri analizinde dikkat edilmesi gereken en önemli husus ısıl işlem ile vejetatif hücrelerin imha edilmesidir.

-Sporlanmanın başlangıcı ya da sporların çimlenmesi aşamasındaki pek çok hücrenin, sporlu bakteri analizinde uygulanan ılımlı ısıl işleme direnç gösteremeyebileceği unutulmamalıdır. Bu durumda sporlu bakteri analizi ile elde

edilecek sonuç tümüyle "analiz aşamasında spor oluşumu tamamlanmış hücrelerin sayısı ya da var/yok testi sonucunu" verecektir.

-Bakteriler, sadece yaşamları tehdit altında olduğunda korunma amacı ile spor oluştururlar. Basit bir örnekle *B. cereus* sporları, soğutulmuş çiğ süte bulaştığında psikrotrof karakteri nedeniyle çimlenme ve çoğalma eğilimi gösterir. Bu nedenle çiğ sütte sporlu *B. cereus* analizi yapıldığında sonuç sıfıra yakın çıkabilir, ancak bu sonuç yukarıda belirtildiği gibi analiz yapılan anda spor oluşumunu tamamlamış *B. cereus* sayısıdır.

-Vejetatif hücrelerin imhası amacıyla uygulanan pastörizasyon işleminde farklı standartlar farklı sıcaklık ve süre önerirler. Pastörizasyonun hangi sıcaklık ve sürede yapıldığı kayıtlara geçilmelidir.

14.24. Diğerleri

Bu bölümde sadece tipik örneklere yer verilmiştir.

14.24.01. Peynirde Geç Şişme Etmeni *Clostridium* spp.

Özellikle hayvan yemi olarak kullanılan silajdan çiğ süte bulaşan ve sporlu bir bakteri olan *Cl. tyrobutyricum*, peynirlerde geç şişmeye neden olarak ekonomik kayıplara neden olur. Buna ilaveten *Cl. butyricum* ve başka anaerop sporlu *Clostridium* türleri de peynirlerde geç şişmeye neden olurlar. Bunlar, peynirin depolanması sırasında laktattan bütirik asit, asetik asit ile CO_2 ve H_2 gazı oluştururlar. Bütirik asit ve asetik asit peynirde tat bozukluğuna yol açarken oluşan gaz peynirde gaz delikleri oluşturur ve Beyaz peynir tenekelerinin şişmesine ve hatta patlamasına neden olur.

Bu grubun analizinde *Bryant Burkey broth* kullanılır. Vejetatif hücrelerin imhası için yapılan pastörizasyon ve EMS yöntemi ile yapılan ekim sonrasında tüplerin üzerine 2 cm kalınlıkta (~4 mL) eritilmiş katı parafin eklenir ve tüpler 37 ^oC'ta ve her 24 saat aralıklarla kontrol edilerek 7 gün inkübe edilir. Katı parafinin besiyerinden yukarı itilmesi pozitif sonuçtur.

14.24.02. Laktik Asit Bakterileri

Bu grup bakterilerin analizinde en yaygın kullanılan besiyerleri laktobasiller için MRS broth ve MRS agar ile laktokoklar için M17 broth ve M17 agardır. Yoğurt yapımında kullanılan *Streptoccus thermophilus* için de M17 broth ve M17 agar kullanılır. Bu besiyerleri selektif karakterde değildirler. Bileşimleri hedef bakterilerin gelişimini destekler, dolayısı ile refakatçi florayı oluşturan bakteriler de bu besiyerlerinde gelişebilirler.

Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarında yürütülen bir çalışmada, çiğ sütlerden *L. bulgaricus* izolasyonu için çiğ süte kazein ve glikoz dışındaki MRS broth

bileşenleri, MRS brothtaki derişim kadar eklenmiştir. Bu amaçla MRS brothtaki derişimin on misli olarak hazırlanan stok çözelti sterilize edilmiş, 90 mL çiğ süte bu stok çözeltiden 10 mL eklenip 44 °C'ta inkübe edilmiş ve MRS agara sürme yapılarak *L. bulgaricus* izolasyonu gerçekleştirilebilmiştir. Burada yapılan özel bir zenginleştirme olup materyalde *L. bulgaricus* sayısı artırılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin analizinde amaca göre farklı inkübasyon sıcaklık ve süreleri uygulanır. Bazı laktik asit bakterileri için anaerobik ya da mikroaerofilik atmosferde inkübasyon yapılır.

Genel olarak MRS agarda gelişen 1-2 mm çaplı, sarı renkli, düzgün ya da iğ şeklinde koloniler laktobasil olarak, M17 agarda gelişen 2-3 mm çaplı, açık sarı renkli, düzgün koloniler laktokok olarak sayılır. Yoğurtta *Lactobacillus bulgaricus* sayımı için MRS agar pH'sının asetik asit ile 5,4'e düşürülmesi önerilmektedir (Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Association, Washington DC, 570 p). Bu amaçla 250 mL MRS agar için sterilizasyon sonrası 45-50 °C'ta 0,23 mL asetik asit ilavesi yeterlidir.

Süt ürünlerinde *Bifidobacterium* spp. sayımı için ISO/DIS 29981/IDF 220 TOS MUP agar önermektedir. Ayrıca *reinforced clostridial agar (RCA)* da bu amaçla kullanılabilir.

14.24.03. *Alicyclobacillus* spp.

Özellikle elma suyunda geliştiğinde petrol ve dezenfektan kokusu oluşturması ile ekonomik kayıplara neden olan termofilik asidofilik karakterli *Alicyclobacillus* spp. analizinde *BAT medium* kullanılır. Filtre edilebilen numunelerle çalışıldığında filtrasyon sonrası membran filtre doğrudan bu besiyerine yerleştirilir. Analiz edilecek numuneye gerekirse zenginleştirme yapılabilir. Bu amaçla farklı sıvı besiyerleri kullanılabileceği gibi numune doğrudan inkübasyona da bırakılabilir. Her koşulda ekim öncesi numune pastörize edilerek vejetatif hücreler öldürülür.

İnkübasyon 45±1 °C'ta 5 gün sürer. Petri kutuları her gün koloni gelişmesi açısından kontrol edilmeli ve kurumanın önüne geçilmesi için besiyeri standart 9 cm Petri kutularına ~20 mL olarak dökülmeli ve/veya mutfak tipi streç film ile sarılmalıdır.

İnkübasyon sonunda gelişen tüm koloniler *Alicyclobacillus* spp. olarak değerlendirilir. K agar ve YSG (yeast extract starch glucose) agarda doğrulanır. Doğrulama sırasında bu besiyerleri, orijinal düşük pH'lı ve nötr pH'lı olarak 2 paralel olarak hazırlanır. *Alicyclobacillus* spp. nötr pH'lı besiyerinde gelişemez. Bu amaçla nötr pH'lı *PCA* ya da *CASO agar* da kullanılabilir.

14.24.04. Asetik Asit Bakterileri

Bu amaçla kullanılan GYC (glucose, yeast extract, calcium carbonate) agar besiyerine, sterilize edildikten sonra alkol ilave edilir. Alkol, asetik asit bakterileri tarafından okside edilerek asetik aside dönüştürülür.

Yayma yöntemi ile yapılan ekim sonrasında aerobik koşullarda 36±1 ^{o}C'ta 24-48 saat (kimi kaynaklara göre 28-30 ^{o}C'ta 3-5 gün) inkübasyon sonunda oluşan berrak zonlu koloniler asetik asit bakterileri olarak değerlendirilir.

14.24.05. *Aeromonas*

Standart şekilde homojenize edilmiş gıda ya da su numunesinden, doğrudan selektif bir katı besiyerine ekim yapılabileceği gibi istenirse zenginleştirme ile de analize başlanabilir. Zenginleştirme amacıyla *CASO brotha* sterilizasyon sonrası oda sıcaklığında 30 mg/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş ampisilin eklenir ve 30 ^{o}C'ta 24±2 saat inkübe edilip bu kültürden selektif bir katı besiyerine sürme yapılabilir. Selektif katı besiyeri olarak *GSP agar* kullanılabilir.

Hatırlatma:

Bu kitapta mikroorganizmaların analizi için kimi yerde 30 °C gibi kesin değerler verilirken kimi bölümlerde 35±1 °C gibi daha geniş sınırlar verilmiştir. Bu farklılıkların nedeni doğrudan bilginin alındığı kaynak ile ilişkilidir.

Gıdaların günlük mikrobiyolojik analizinizde, örneğin toplam mezofilik aerobik koloni ya da maya-küf analizindeki inkübasyon sıcaklığında ±2 °C sapma, sonucu fazla etkilemez. Analiz sonucunda olası olumsuzluk yüksek sıcaklıktan kaynaklanır. 37 °C'a ayarlanmış inkübatörün sıcaklık dağılımı ±2 °C ise inkübasyonun 35 - 39 °C arasında olacağı açıktır ve 39 °C, özellikle stres altındaki mikroorganizmaya zarar verebilir.

İnkübatörlerin alt ve üst raflarındaki sıcaklık dağılımı maksimum-minimum termometre ile kontrol edilmeli, gerekirse düzeltici işlem uygulanmalıdır. Tanımlama amacıyla belirli bir sıcaklıkta gelişme testi yapılıyorsa mikroprosesör kontrollü su banyosu kullanılmalıdır.

Benzer durum pH için de geçerlidir. Bir bakterinin optimum gelişme pH'sı 7,2 ancak bu bakteri için selektif besiyerinin ambalajında pH'nın 7,2±2 olduğu yazılmış olabilir. Buradan bu bakteri için optimum gelişme pH'sının 7,0 - 7,4 olduğu ortaya çıkar ve analiz sonucu bu farklılıktan etkilenmez. Tanımlama amacıyla, örneğin pH 9,6'da gelişme testinde durum farklıdır.

İnkübasyon süresinde de benzer farklılıklar vardır. Kimi kaynaklar, aynı bakterinin analizi için süreyi örneğin 24 saat kimileri 24±2 vermektedir. Ancak *Salmonella* analizinde selektif olmayan ön zenginleştirme 18 saati geçmemelidir. Koliform grup ve özellikle *E. coli* analizinde kullanılan CCA besiyerinde 24 saat inkübasyondan sonara yapılan okumalar geçersizdir. Yine koliform grup bakteri analizinde sıklıkla görülen 24-48 inkübasyon süresinin şu anlama geldiği unutulmamalıdır: Standart inkübasyon süresi 24 saattir, ancak bu süre içinde gelişme olmazsa sahte negatif sonuçtan sakınmak ve/veya negatif sonucun kesinleştirilmesi için inkübasyona 24 saat daha devam edilmelidir.

15. BESİYERLERİ, ÇÖZELTİLER VE DİĞER GEREÇLER

Özlem E. SAĞDAŞ, Bilge HALKMAN, Gülten KOLCUOĞLU

15.01. Genel Bilgiler **543**
15.02. Seyreltme Çözeltileri **544**
15.02.01. Maximum Recovery Diluent; MRD 546
15.02.02. Ringer Çözeltisi; ¼ Kuvvetinde 546
15.02.03. Anaeroplar için Seyreltme Çözeltisi 546
15.03. Genel Amaçlı Besiyerleri **547**
15.03.01. CASO (Tryptic Soy) Broth 547
15.03.02. CASO (Tryptic So) Agar 547
15.03.03. Brain Heart (Infusion) Broth 547
15.03.04. Brain Heart (Infusion) Agar 547
15.03.05. Phenol Red Broth (base) 548
15.03.06. Kanlı (blood) Agar (base) 548
15.03.07. Skim Milk Powder 549
15.03.08. Sterikon; Biyolojik Sterilizasyon İndikatörü 549
15.03.09. Su Agar 550
15.04. Toplam Aerobik Koloni **550**
15.04.01. Plate Count Agar 550
15.04.02. Plate Count Skim Milk Agar 550
15.04.03. Yeast Extract Agar acc. to ISO 6222 551
15.05. Anaerop Bakteriler **551**
15.05.01. Anaerobik İnkübasyon Gereçleri (Anaerocult) 551
15.05.02. Reinforced Clostridial Agar 554
15.05.03. Sulfite Iron Agar (Base) 555
15.05.04. Reinforced Clostridial Medium 555
15.05.05. Fluid Thioglycollate Medium 555
15.05.06. Thioglycollate Broth 556
15.06. Maya ve Küfler **556**
15.06.01. Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) 556
15.06.02. Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) 557
15.06.03. Potato Dextrose Agar 557
15.06.04. YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) Agar 557
15.07. Toplam Enterobacteriaceae **558**
15.07.01. Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar 558
15.07.02. OF Bazal Medium 558
15.08. Koliform Grup Bakteriler, Fekal Koliformlar ve *E. coli* **559**
15.08.01. VRB (Violet Red Bile) Agar 559
15.08.02. Lauryl Sulfate Tryptose (LST) Broth 560
15.08.03. Brilliant Green Bile (BGB) %2 Broth 560
15.08.04. Chromogenic Coliform Agar (CCA) 560
15.08.05. Readycult Coliforms 561
15.08.06. Fluorocult LMX Broth 562

15.08.07. EC Broth ... 562
15.08.08. TBX Agar ... 563
15.08.09. Fluorocult VRB Agar ... 563
15.08.10. Tryptone Water ... 564
15.08.11. Kovacs' İndol Çözeltisi ... 564
15.08.12. Fluorocult LST Broth ... 564
15.08.13. UV El Lambası ... 565
15.09. *E. coli* O157:H7 serotipi ... 565
15.09.01. mTSB + novoicin ... 565
15.09.02. SMAC Agar Base ... 565
15.09.03. SMAC Agar CT Katkısı ... 566
15.09.04. Singlepath *E. coli* O157 ... 566
15.10. *Salmonella* ... 567
15.10.01. Tamponlanmış Peptonlu Su ... 567
15.10.02. Rappaport-Vassiliadis Soy (RVS) Broth ... 567
15.10.03. Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin (MKTTn) Broth ... 567
15.10.04. Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium ... 568
15.10.05. MSRV Selective Supplement ... 569
15.10.06. XLD Agar ... 569
15.10.07. Singlepath *Salmonella* ... 569
15.10.08. Triple Sugar Iron Agar ... 570
15.10.09. Lysine Iron Agar ... 570
15.10.10. Urea Broth ... 571
15.11. *Cl. perfringens* ve Sülfit İndirgeyen Anaeroplar ... 571
15.11.01. Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar Base ... 571
15.11.02. TSC Agar Katkısı ... 572
15.11.03. Sulfite Iron Agar (Base) ... 572
15.12. *Listeria monocytogenes* ... 572
15.12.01. Fraser Selective Enrichment Broth Base ... 572
15.12.02. Fraser *Listeria* Selective Supplement ... 573
15.12.03. Fraser *Listeria* Ammonium Iron (III) Supplement ... 573
15.12.04. *Listeria* Selective Agar (base) acc. Ottaviani and Agosti ... 574
15.12.05. *Listeria* Agar acc. Ottaviani and Agosti Selective Supplement ... 574
15.12.06. *Listeria* agar acc. Ottaviani and Agosti Enrichment Suppl. ... 575
15.12.07. PALCAM Agar (base) ... 575
15.12.08. PALCAM Agar Selective Supplement ... 576
15.12.09. Oxford *Listeria* Selective Agar (base) ... 576
15.12.10. Oxford *Listeria* Selective Supplement ... 576
15.12.11. Singlepath *Listeria* mono ... 576
15.13. *Staphylococcus aureus* ... 577
15.13.01. Baird-Parker Agar (base) ... 577
15.13.02. Egg Yolk Tellurite Emulsion ... 578
15.13.03. Bactident Coagulase ... 578
15.13.04. Giolitti-Cantoni Broth ... 578

15.14. *Campylobacter jejuni* **579**
15.14.01. Bolton Selective Enrichment Broth Base 579
15.14.02. Bolton Broth Selective Supplement 580
15.14.03. mCCD agar (base) 580
15.14.04. CCDA Selective Supplement 581
15.14.05. Singlepath *Campylobacter* 581
15.15. *Vibrio parahaemolyticus* **581**
15.15.01. Alkaline Saline Peptone Water (ASPW) 581
15.15.02. Thiosulfate Citrate Bile and Sucrose (TCBS) Agar 581
15.16. *Cronobacter sakazakii* **582**
15.16.01. *Cronobacter* Selective Broth (base) 582
15.16.02. CSB Selective Supplement 582
15.06.03. Chromocult CCI (Chromogenic *Cronobacter* Isolation) agar 583
15.17. *Bacillus cereus* **583**
15.17.01. Mannitol Egg yolk Polymyxin (MYP) Agar 583
15.17.02. Polymyxin B Sulfate 584
15.17.03. Egg yolk Emulsion 50% 584
15.17.04. CASO Broth + Polymyxin B Sulfate 584
15.18. Enterokoklar **585**
15.18.01. Chromocult *Enterococci* Agar 585
15.18.02. Slanetz and Bartley Agar 585
15.18.03. ReadyCult *Enterococci* 586
15.19. *Pseudomonas* **586**
15.19.01. *Pseudomonas* CFC/CN Agar (Base) 586
15.19.02. *Pseudomonas* CN Selective Supplement 586
15.19.03. *Pseudomonas* CFC Selective Supplement 587
15.19.04. King Agar B, Base (Dansk Standard) 587
15.20. Diğer Besiyerleri **587**
15.20.01. Shigella Broth Base 587
15.20.02. Peptone Sorbitol Bile (PSB) Broth 588
15.20.03. BAT Medium 588
15.20.04. GSP Agar (Base) 588

15.01. Genel Bilgiler

Bu bölümde verilen besiyerlerinin bir kısmı 500 mL, 80 mL ya da 476 mL gibi farklı hacimlerde hazırlanmaktadır. Okuyucu bu konuda dikkatli olmalıdır. Devamında ISO vb. uluslararası kuruluşlar besiyeri içeriğinde değişiklikler yapabilmekte ve bu gibi değişiklikler doğrudan besiyeri hazırlanma şeklini etkileyebilmektedir. Buna bağlı olarak hangi marka olursa olsun kullanıcı besiyeri kutusundaki hazırlama talimatlarını kontrol etmelidir. Ayrıca aynı besiyeri çeşidi olsa bile başta kullanılan agarın jelleştirici gücüne bağlı olarak farklı markalarda farklı miktarlarda tartımlar olabilmektedir.

Sıvı (broth) olanlar da dâhil olmak üzere bütün besiyerleri ve çözeltiler gerekirse ısıtılarak saf su içinde tam olarak eritildikten sonra otoklavlanmalıdır. Agarlı besiyerleri her koşulda otoklav öncesi ısıtılarak agarın tam olarak eritilmesi gerekir. VRB agar gibi bazı besiyerleri otoklavlanmaz. Bu gibi besiyerlerinde, sadece agarın tam olarak eritilmiş olduğu minimum ısıl işlemin amaca uygun selektif sterilizasyon için tümüyle yeterli olduğu unutulmamalıdır (bknz⇒ 05.10. bölüm).

Sterilizasyon sonrası agarlı besiyeri 40-45 ^{o}C'a soğuyunca steril Petri kutularına dökülür. Standart 9 cm çaplı Petri kutusuna ~12,5 mL agarlı besiyeri dökülmesi (100 mL besiyerinin 8 Petri kutusuna olabildiğince eşit olarak dağıtılması) ile Petri kutusunda ~2 mm besiyeri kalınlığı sağlanır. Bu kalınlık, çoğu analiz için yeterlidir. İnkübasyon yüksek sıcaklıkta ve/veya uzun süreli yapılacaksa kurumanın önüne geçilmesi için besiyeri orantılı olarak daha fazla miktarda dökülmesi ve/veya Petri kutularının mutfak tipi streç filme sarılarak inkübasyona bırakılması da geçerli bir çözümdür. Özellikle büyük kapasiteli inkübatörlere bir kap içinde doymuş KCl çözeltisi konulması ile sabit bağıl nem sağlanır.

Bu bölümde gıda mikrobiyolojisinde kullanılan bütün seyreltme çözeltileri ve besiyerleri değil sadece en fazla kullanılanlar verilmiştir. Bu bölümde bulunmayan besiyerlerin pek çoğuna www.mikrobiyoloji.org adresinden erişilebilir. Ayrıca ISO, FDA vb. uluslararası kuruluşların standartlarında yeni besiyerleri ve analiz yöntemleri yayımlanmaktadır. Okuyucunun bu gibi gelişmeleri yine www.mikrobiyoloji.org sitesinden izlemeleri önerilir.

Besiyerlerinin ve çözeltilerin tümü in vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde kullanılır.

Aynı besiyerine farklı ticari kuruluşlar farklı isimler vermektedir. Buna en tipik örneklerden birisi tryptic soy broth (TSB) ve CASO brothtur. Kitap içinde bu gibi eşdeğer besiyeri isimleri belirtilmiştir.

Metin içinde örneğin, kasten kimi paragrafta cefixime kimi paragrafta sefiksim yazılmıştır. Buradaki amaç okuyucuya gerek Türkçe gerek İngilizce kullanımını hatırlatmaktır.

15.02. Seyreltme Çözeltileri

Bütün seyreltme çözeltileri otoklavlama öncesi gerekirse ısıtılarak saf suda tam olarak eritilmelidir.

Mikrobiyolojik analizlerde gerek homojenizasyon gerek ardışık seyreltmeler sırasında ozmotik dengenin sağlanması için çeşitli çözeltiler kullanılır. Öncesinde bileşimi basitçe %0,85 NaCl olan ve serum fizyolojik (fizyolojik tuzlu su) kullanılırken artık bunun yerini maximum recovery diluent almıştır. %0,1 pepton çözeltisi de homojenizasyon ve seyreltme amaçlı kullanılabilir.

Mayonez gibi yağlı gıdalar, ozmofiller, halofiller ve anaeropların analizinde farklı çözeltiler kullanılır. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF), süt ürünlerinin analizi için ¼ Ringer çözeltisi önermektedir. Peynirler için %2 sodyum sitrat çözeltisi de homojenizasyon/ seyreltme için kullanılabilir.

FDA, genel homojenizasyon ve seyreltme çözeltisi olarak Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (Buffered Dilution Water) önermektedir. Hazırlanması için 34 g KH_2PO_4 gerekirse hafifçe ısıtılarak 500 mL saf suda çözülür,1 N NaOH ile pH'sı 7,2'ye ayarlanır ve saf su ile 1 L'ye tamamlanır. Bu, stok çözeltidir. Otoklavda 121 ^oC'ta 15 dk süre ile sterilize edilerek buzdolabında saklanır. Homojenizasyon/ seyreltme çözeltisi hazırlamak için stok çözeltiden 1,25 mL alınarak saf su ile 1 L'ye tamamlanır, uygun hacimlere dağıtılıp, Otoklavda 121 ^oC'ta 15 dk süre ile sterilize edilir. Bu çözelti American Public Health Association (APHA) tarafından Buffered Dilution Water adı ile de bilinir ve deniz suyu ile kabukluların analizinde kullanılabilir.

Vibrio parahaemolyticus ve diğer halofillerin homojenizasyonunda ve ardışık seyreltmelerde FDA tarafından Phosphate Buffered Saline (pH 7,4) önerilmektedir. Bileşimi, 7,650 g NaCl; 0,724 g susuz Na_2HPO_4; 0,210 g KH_2PO_4 şeklindedir. Bileşenler 1 L suda çözündürülür, 1 N NaOH ile pH'sı 7,4'e ayarlanır, uygun kaplara dağıtılıp, otoklavda 121 ^oC'ta sterilize edilir.

Yersinia enterocolitica analizinde gıda numunesinin homojenizasyonu için peptone sorbitol bile (PSB) broth kullanılır.

Tuzla korunmuş etler, turşular, süt ürünleri gibi gıdalarda halofil bakteriler aranacak ise homojenizasyon ve seyreltme çözeltilerinde %2-3 NaCl olmalıdır. Phophate buffered saline de bu amaçla kullanılabilir.

Yağ oranı yüksek gıdaların homojenizasyonu için Tween 80 kullanılabilir. Bu amaçla seyreltme sıvısı içine (sterilizasyon öncesinde) %0,1-1,0 oranında Tween 80 katılması özellikle krema gibi çok yağlı süt ürünleri için önerilmektedir. İlave edilecek Tween 80 miktarı, numunedeki yağ oranı ile ilgilidir. Örneğin %30 yağlı bir ürün için pratik olarak %0,3 Tween 80 eklenir.

Benzer şekilde mayonez için Triton x100'ün %1'lik çözeltisinden 90 mL'ye 1 mL ilavesi ile daha iyi bir homojenizasyon sağlanmaktadır. Yağlı gıdaların analizinde Triton x100 kullanılması ISO ve FDA gibi uluslararası standartlarda geçmektedir.

Reçeller, meyve suyu konsantreleri gibi şekerli gıdalarda ozmofilik mayaların analizinde homojenizasyon ve seyreltme için %20, %35 ya da %50 glikoz çözeltisi veya %30 gliserol çözeltisi kullanılır. Kuru gıdaların analizinde kserofil küfler için de %30 gliserol önerilmektedir.

Bu çözeltilerin dışında daha pek çok çözelti de özel amaçlarla kullanılabilmektedir. Örneğin asidofil mikroorganizmalar ile çalışılırken homojenizasyon ve seyreltme çözeltilerinin pH'sı düşük olmalıdır. Hedef mikroorganizmaya göre uygun pH seçilir.

Kuru gıdalarda erimeyi kolaylaştırmak için, ilk seyreltmenin yapılacağı erlene sterilizasyon öncesinde yaklaşık 6 mm çaplı cam boncuk atılması önerilmektedir. Cam boncuk kullanılması hardal, fındık ezmesi ürünleri, krema vb. gibi kolay erimeyen gıdalar için de önerilir. Homojenizasyon stomacherda yapılacaksa cam boncuk kullanılmaz.

Seyreltme çözeltileri, her 6 ayda bir olmak üzere toksik maddelerin varlığı açısından kontrol edilmelidir. Basit olarak, sayım sonucunun sağlıklı olarak alınacağı (yaklaşık 100 KOB/ Petri kutusu) seyreltiden, seyreltme yapıldıktan 0; 15; 30 ve 45 dk sonra tercihen plate count agara (PCA) ekim yapılır. Bu amaçla çiğ süt kullanılabilir ve gerekirse birden fazla seyreltiden ekim yapılabilir. Eğer 45. dk sayımları 0. dk sayımlarına oranla %20'den daha az ise bunun nedeni saptanıp düzeltici işlem uygulanır ve tekrar test edilir. Bununla ilgili kayıtlar tutulmalıdır.

15.02.01. Maximum Recovery Diluent; MRD (Merck 1.12535)

ISO 6887 ve ISO 8199'a uygun genel amaçlı bir seyreltme çözeltisidir. Bu standarda göre 9,5 g/L olacak şekilde hazırlanır. Kaplara amaca göre 225 mL, 90 mL, 9 mL olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,0±0,2'dir. Otoklav sonrasında laboratuvar sıcaklığında 1 ay depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre maximum recovery diluent ile 52,6 L seyreltme çözeltisi hazırlanabilir.

15.02.02. Ringer Çözeltisi; ¼ Kuvvetinde (Merck 1.15525)

Verilen bileşim doğrudan ¼ kuvvetinde olan standart kullanım içindir ve Ringer çözeltisi her zaman ¼ kuvvetinde olarak anılır. ISO 6887 ve IDF'ye uygun bir seyreltme çözeltisidir. Genel olarak süt ve ürünleri için kullanılsa da özellikle ozmotik basınç değişikliği nedeni ile hasar görmüş ve/veya hassas bakteriler için de önerilmektedir. ¼ Ringer çözeltisi hazırlamak için 1 tablet 500 mL saf suya ilave edilip karıştırılır, erlen ve/veya tüplere uygun hacimlerde dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 6,9 ±0,1'dir. 1 kutudaki 100 tablet ile 50 L çözelti hazırlanabilir.

15.02.03. Anaeroplar için Seyreltme Çözeltisi

Anaeropların homojenizasyonu ya da seyreltmeleri için ortamdaki oksijeni bağlayan çözeltiler kullanılmalıdır. Bu amaçla pepton from casein %0,1; L-cystein chloride monohydate %0,05 ve NaCl %0,85 olacak şekilde bileşenler saf su içinde gerekirse ısıtılarak eritilir ve uygun kaplara (erlen ve/veya tüpler) dağıtılarak otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Bu amaçla bileşimi %0,5 NaCl; %0,2 glikoz ve %0,03 cystein chloride monohydate olan çözelti de kullanılabilir.

15.03. Genel Amaçlı Besiyerleri

15.03.01. CASO (Tryptic Soy) Broth (Merck 1.05459)

Çok amaçlı genel sıvı besiyeridir. ISO, BAM, EP, JP ve USP standart ve yönergelerine uygundur. Orijinal ismi "Casein-Peptone Soymeal-Peptone" olsa da yaygın olarak CASO ya da tryptic soy broth / agar olarak anılır. Dehidre besiyeri 30,0 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir. Amaca uygun şekilde tüplere ve/veya erlenlere dağıtılıp, otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renktedir ve buzdolabında 2 ay depolanabilir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,3±0,2'dir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 16,6 L besiyeri hazırlanabilir.

CASO brothun hayvan kökenli olmayan proteinlerden hazırlanmış (tryptic soy broth (TSB) non animal origin Merck 1.00525), ışınlanarak sterilize edilmiş (tryptic soy broth, irradiated Merck 1.00800) ve hayvan kökenli olmayan proteinlerden hazırlanıp ışınlanarak sterilize edilmiş (tryptic soy broth non animal origin, irradiated Merck 1.00550) dehidre besiyeri formları da vardır.

15.03.02. CASO (Tryptic Soy) Agar (Merck 1.05458)

Çok amaçlı genel katı besiyeridir. ISO, BAM, EP, JP ve USP standart ve yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri 40,0 g/L olacak şekilde kaynatılarak saf su içinde eritilir. Otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilip steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renktedir ve buzdolabında 2 ay depolanabilir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,3±0,2'dir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 L besiyeri hazırlanabilir. CASO agarın analiz edilen numuneki kalıntı dezenfektanları inaktive eden (tryptic soy agar (CASO) with polysorbate 80 and lecithin, Merck 1.07324) dehidre besiyeri formu da vardır.

15.03.03. Brain Heart (Infusion) Broth (Merck 1.10493)

ISO 6888'e uygundur. Zor gelişen mikroorganizmaların geliştirilmesi için yaygın olarak kullanılır. Koagülaz testinde izolatın bu besiyerinde geliştirilmesi önerilir (bknz⇒ 06.04.03.21. Koagülaz Testi). Dehidre besiyeri 37 g/L olacak şekilde saf su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilip tüplere 10'ar mL dağıtılır ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,4±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahverengidir. Buzdolabında 2 ay depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 13,5 L besiyeri hazırlanabilir.

15.03.04. Brain Heart (Infusion) Agar (Merck 1.13825)

Dehidre besiyeri 52 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak eritilir, otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir ve steril Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,4±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve bazen hafif

opalesent (meneviş, yanardöner) ve kahverengidir. Buzdolabında 2 ay depolanabilir. Brain heart infusion broth besiyerine 15 g/L olacak şekilde agar-agar ilavesi ile de brain heart agar besiyeri hazırlanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 9,6 L besiyeri hazırlanabilir.

15.03.05. Phenol Red Broth Base (Merck 1.10987)

Bakterilerin karbohidrat testleri ile tanımlanmasında kullanılır (bknz⇒ 06.04.03.10. Karbohidrat Testleri). Bu besiyerinin hazırlanması standart besiyeri hazırlamasından farklıdır. Dehidre besiyeri 1,5 g/ 80 mL olarak saf su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir, tüplere 4'er mL dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Denenecek karbohidrat 0,5-1,0 g/ 10 mL olarak hazırlanıp, filtre ile sterilize edilir ve tüplerdeki besiyeri üzerine 1 mL eklenir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve phenol red indikatörüne bağlı olarak kırmızı renktedir, 25 ºC'ta pH'sı 7,4±0,2'dir. Oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Tüplere bakteri ilavesinden sonra uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda rengin sarıya dönüşmesi bakterinin denenen karbohidrattan asit oluşturduğunu (şekeri fermente ettiğini) gösterir. Burada verilen şeker konsantrasyonu %1'dir ve bu konsantrasyon literatürde yaygın olarak %0,5-1 olarak belirtilmektedir. Ancak şeker konsantrasyonun %1'den az olması halinde sahte negatif sonuçlar alınabilmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 26,6 L bazal besiyeri hazırlanabilir.

Phenol red broth base ile bakteri tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan karbohidratlar şunlardır: Adonitol, L(+)-arabinose, dulcitol, esculin, D(-)-fructose, D(+)-galactose, D(+)-glucose monohydrate, glycerol about 87%, glycogen, inulin, D(-)-mannitol, maltose monohydrate, meso-erythritol, myo-inositol, raffinose pentahydrate, L(+)-rhamnose; monohydrate, salicin, D(-)-sorbitol, starch, sucrose, trehalose dihydrate ve D(+)-xylose.

15.03.06. Kanlı (Blood) Agar Base (Merck 1.10886)

Hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi için kullanılır (bknz⇒ 06.04.03.24. Hemoliz Testi). Dehidre besiyeri 40 g/L olacak şekilde kaynatılarak saf su içinde eritilip otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav çıkışında ~45 ºC'a soğutulur, %5 oranında ve 35-37 ºC'a ısıtılmış defibrine koyun kanı ilave edilir, karıştırılır ve steril Petri kutularına dökülür. Bazal besiyeri berrak ve sarımsı kahverenginde olup 25 ºC'ta pH'sı 6,8±0,2'dir. Kan ilave edilmiş besiyeri buzdolabında en çok 3 ay depolanabilir. Standart ekimden ve inkübasyondan sonra kanlı agar Petri kutuları hemoliz açısından değerlendirilir. *S. aureus*, tipik β hemoliz oluşturur. Bu besiyerinin dış laboratuvarlardan sağlanması önerilir. At, sığır gibi hayvanların yerine koyun kanı kullanılmasının nedeni koyundan kan alınmasının çok kolay olmasıdır. İnsan kanı kullanılmamasının nedeni kan gruplarıdır. Adı geçen diğer hayvan kanlarında kan grubu farkı olmadığı için antijenik özellikleri yoktur. İnsan kanı kullanılması klinik mikrobiyolojide bazı sahte pozitif reaksiyonlara neden olabildiği için benimsenmemektedir. Kan bileşiminde bulunan fibrinler, kanı

pıhtılaştıran faktörlerden birisidir. Besiyeri bünyesine katılacak kanın pıhtılaşmamış olması gerekir ve buna bağlı olarak kan defibrine edilir. Geçmiş dönemlerde kan, içinde cam boncuk olan tüplere alınıp, mekanik olarak elle karıştırılarak fibrinlerin cam boncuk üzerinde toplanması ve dolayısı ile kanın pıhtılaşmaması sağlanırken artık doğrudan antikoagülant içeren tüplere kan alınmaktadır. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 12,5 L bazal besiyeri hazırlanabilir.

15.03.07. Skim Milk Powder; Yağsız Süt Tozu

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan süt tozunun antibiyotik içermeyen sütlerden yapılmış ve yağı ayrılmış olması gerekir. Dehidre skim milk (yağsız süt tozu) %10 olacak şekilde hazırlanabildiği gibi, çeşitli besiyerlerine de ilave edilebilir. Standart hazırlama şeklinde 10,0 g yağsız süt tozu 100 mL saf suda hafifçe ısıtılarak tam olarak eritilir, uygun kaplara dağıtılıp, otoklavda 115 ºC'ta 10 dk ya da 110 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Bu norm, bazen sporlu bakteriler için yeterli olmamakta ve denemeler aksamaktadır. Çözüm, süttozu eritildikten sonra hemen otoklavlama değil, 1 saat süre ile oda sıcaklığında bekletildikten sonra otoklavlamaktır. Bu besiyerinin önce 80-85 ºC'ta 5-10 dk tutulması, ardından hızla oda sıcaklığına soğutulup, 2-3 saat bekletildikten sonra otoklavlanması da geçerlidir. 80-85 ºC'ta 5-10 dk tutup hızla soğutmak, sporların germinasyonunu teşvik eder. Nasıl hazırlanırsa hazırlansın, denemeye başlamadan önce hazırlanmış skim milk besiyerinin, inkübatörde 37 ºC'ta 48 saat tutularak steril olduğunun kontrolü önerilir.

15.03.08. Sterikon; Biyolojik Sterilizasyon İndikatörü (Merck 1.10274)

USP ve EP tarafından özellikle farmasötik ürünlerde otoklavlama etkinliğinin kontrolü için önerilmektedir. *Geobacillus stearothermophilus* (syn. *Bacillus stearothermophilus*) sporları ısıl işleme çok dirençlidir. Otoklavlama işlemi sırasında bu bakteri sporunun tümüyle yok edilmiş olması aynı otoklavlama sürecinde otoklavlanan tüm malzemenin sterilize edildiğini gösterir. Sterikon, bu amaçla hazırlanmış ve içinde canlı sporlar, bu bakteri için besiyeri ve pH indikatörü bulunan 2 mL hacimli bir ampuldür. Başlangıçta menekşe rengi olan spor çözeltisi otoklavlandıktan sonra 60 ºC'ta 24 saat inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda rengin değişmemiş olması sporların tümüyle ölmüş olduğunu gösterir. Otoklavlama sırasında tek 1 spor dahi canlı kalmış ise inkübasyon sırasında çimlenerek çoğalır, besiyeri rengini menekşeden sarı-turuncuya çevirir (bknz⇒ Ek B01). Spor süspansiyonun buzdolabında korunması gerekir. Oda sıcaklığında en çok 1-2 hafta kadar depolanması mümkündür. 250 L kapasiteye kadar olan otoklavlar için en az 2 ampul, daha büyük otoklavlar için en az 6 ampul kullanılması önerilir. Ampullerin, otoklavın farklı yerlerine ve kırılmamasına dikkat edilerek yerleştirilmesi gerekir. Otoklava yerleştirme öncesi, ampullerin iyice karıştırılarak, sporların ampul içine tam dağılması sağlanmalıdır. Otoklav çıkışında ampuller inkübatöre yerleştirilirken 1 adet

otoklavlanmamış (şahit) ampulünde inkübatöre konulması önerilir. İnkübasyon sonunda şahit ampul sarı-turuncu renk almalıdır.

15.03.09. Su Agar

Saf su içinde %1,5 olacak şekilde agar-agar kaynatılarak eritilir, otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Besiyeri değildir, tüplerin üzerine ya da agarlı besiyerleri üzerine ilave edilerek kısmi bir anaerop ortam sağlamak için kullanılır. Analiz edilen numunede yayılıcı basiller varsa, ekim sonrasında ~40 ºC'ta tutulan su agardan 5-6 mL ilavesi ile basil kolonilerinin yayılması baskılanır. Ticari olarak agar-agar üretiminde zaman içinde ve bir anlamda tarımsal üretimdeki sorunlara bağlı olarak sorunlar yaşanabilmektedir. Böyle sorunlar ile karşılaşıldığında, örneğin PCA ya da amaca uygun bir agarlı besiyeri de su agar yerine kullanılabilir. Analiz raporunda hangi besiyerinin bu amaçla kullanıldığı açık bir şekilde belirtilmelidir.

15.04. Toplam Aerobik Koloni

15.04.01. Plate Count Agar (Merck 1.05463)

Genel içerikli besiyeridir. ISO 4883, ISO 17410 ile BAM ve EPA yönergelerine uygundur. Casein-peptone dextrose yeast agar adı ile de bilinir ve kısaca PCA olarak anılır. Gıda endüstrisinde toplam aerobik koloni sayımı için yaygın olarak kullanılır. Dehidre besiyeri 22,5 g/L olacak şekilde kaynatılarak saf su içinde eritilir. Otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilip, steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak, açık sarımsı renktedir ve 25 ºC'ta pH'sı 7,0±0,2'dir. Buzdolabında 2 ay depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 22,2 L besiyeri hazırlanabilir.

Bazı gıdaların analizinde ve özellikle katı gıdalarda 10^{-1} ile sıvı gıdalarda orijinal numuneden (10^{0} seyreltiden) yapılan ekimlerde, gıda partikülleri ile bakteri kolonilerinin karışmasını önlemek için en etkin yöntemlerden birisi, 45 ºC'a soğutulmuş 100 mL plate count agar besiyerine, filtre ile sterilize edilmiş %0,5 derişimdeki 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) çözeltisinden 1 mL eklemektir. TTC eklenen plate count agar besiyerinde inkübasyon sonrasında koloniler kırmızı pigmentli olur ve kolaylıkla gıda partiküllerinden ayrılır. Bu yöntem, salça gibi kırmızı partiküllü gıdalara uygulanamaz.

15.04.02. Plate Count Agar + Skim Milk

Yaygın kullanım alanı süt ürünlerinde toplam aerobik koloni sayımı içindir. Ticari firmalar tarafından hazırlamış dehidre besiyerleri talimata uygun olarak hazırlanmalıdır. Standart plate count agar besiyerine antibiyotik içermediği sertifikalandırılmış yağsız süt tozundan 1 g/L ilavesi ile de hazırlanabilir.

15.04.03. Yeast Extract Agar acc. to ISO 6222 (Merck 1.13116)

İnsani kullanım amaçlı sularda toplam jerm (toplam aerobik mezofilik bakteri) sayımı içindir. ISO 6222'ye uygundur. Sulardaki toplam jerm sayımı ve aranması için kullanılan genel katı besiyeridir. Besiyerinde inhibitör ve indikatör yoktur. Çok farklı bakteri, maya ve küf türleri bu besiyerinde gelişebilir. Dehidre besiyeri, 24,0 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak eritilip, otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilip steril Petri kutularına dökülür. Otoklav sonrası besiyeri sıcaklığı 45-50 °C'a düşünce ISO 6222'ye göre dökme yöntemi ile ekim yapılır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı-kahverengi renktedir ve pH'sı otoklav sonrası 25 °C'ta 7,2±0,2'dir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 20,8 L hazırlanabilir.

Dikkat: Yeast Extract Agar acc. to ISO 6222 (Merck 1.13116) ile Yeast Extract Agar (Merck 1.03750) bileşim ve kullanılma amacı farklı olan 2 ayrı besiyeridir.

15.05. Anaerop Bakteriler

15.05.01. Anaerobik İnkübasyon Gereçleri (Anaerocult Sistemi)

Anaerop olarak tanımlanan mikroorganizmalar gelişmeleri için özel atmosfer koşullarına gerek duyarlar. Bu grup içinde havayı (daha doğru bir deyimle oksijeni) farklı derecelerde tolere eden gruplar vardır. Zorunlu (obligat) anaerop bakterilerin gelişimi için ortamda oksijen kesinlikle istenmez iken aerotolerantlar belirli bir miktar oksijeni tolere edebilirler. Mikroaerofilik/ kapneikler ise gelişmeleri için çok az oksijen yanında belirli derişimde CO_2'e gerek duyarlar. Mutlak anaeroplar ile çalışılırken inokülasyon aşamasında da anaerop atmosfer gerekir. Gıda endüstrisinde aranacak/ sayılacak anaeroplar için bu şekilde anaerop inokülasyonlara gerek yoktur. Sadece gıda örneğinin analize hazırlanması aşamasında aşırı hava ile temasından kaçınılması gerekir.

Anaerop bakteriler, insan ve hayvanların normal bakteriyel florası içinde yer alırlar. Tıbbi mikrobiyolojideki patojenik önemleri ve gıda hijyenindeki önemli rollerine karşın uzun süre ihmal edilmişler ve gerek tıbbi mikrobiyolojide gerek gıda hijyeninde hep aerop mikroorganizmalar ile çalışılmıştır. Özellikle 1980'li yıllarda başlayan anaeropların kültivasyonundaki gelişmeler ile bu grup mikroorganizmalar daha iyi olarak tanınmışlar ve bunlara verilen önem, zaman içinde giderek artmıştır.

Bacteriodes, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* türleri klinik mikrobiyolojide önemli iken *Clostridium* türleri hem klinik mikrobiyolojide hem de gıda mikrobiyolojisinde önem taşır. Bu grup mikroorganizmaların morfolojileri, Gram reaksiyonları ve doğal habitatları önemli farklılıklar gösterirken tümünün ortak yanı gelişme ve çoğalmaları için analizlerin tüm aşamalarında anaerop ortama gerek duymalarıdır.

Neisseria, *Campylobacter* ve *Haemophilus* türleri mikroaerofilik/ kapneik bakteriler olarak tanımlanmaktadırlar. Bunlar arasında *Campylobacter* türlerinin

gıda mikrobiyolojisindeki önemi yüksektir. Bu gruba giren bakteriler belirli miktarda CO_2 isterler. Bu nedenle geliştirilmeleri için anaerop bakterilerden farklı atmosfer gerekir.

Anaerocult sistemi, anaerop veya mikroaerofilik/ kapneik atmosfer ortam oluşturan sistemlerdir. Anaerocult ürünlerinde su ile reaksiyon sonunda belirli bir hacim (anaerobik kavanoz veya inkübasyon torbası) içinde atmosferik oksijenin tümünün ya da bir kısmının bağlanması ve aynı anda CO_2 açığa çıkmasını sağlayan kimyasallar vardır. Reaksiyon sonunda atmosfer CO_2 açısından zenginleşirken oksijen tümüyle (anaerop ortam) ya da kısmen (mikroaerofilik/ kapneik ortam) uzaklaştırılmış olur.

Anaerocult sistemlerinde ilave bir katalist kullanımına gerek yoktur. Kullanım basit ve güvenlidir. Yeterli, hızlı ve istenen düzeyde oksijen ve kısmi CO_2 basıncı sağlanır. Analiz edilecek numune sayısına göre farklı seçenekler sağlanmıştır. Böylece kullanımı ekonomiktir. Tipik bileşimleri kiselgur, demir tozu, sitrik asit ve kalsiyum karbonattır. Anaerocult ürünlerinde tehlikeli olabilecek O_2/ H_2 sınırına ulaşılmaz.

Anaerocult A (Merck 1.13829)

Anaerobik kavanozda 12 Petri kutusuna kadar olan anaerop inkübasyon ortamı sağlamak için kullanılan poşettir. Reaksiyonun başlaması için sadece su ilavesi yeterlidir. Atmosferik oksijen, kimyasal olarak bağlandığı için hidrojen ile reaksiyona girmez. Kimyasal bileşimin konulduğu özel kâğıt ilave edilen suyun tam olarak difüzyonuna, atmosferik oksijenin kimyasal olarak bağlanmasına ve CO_2 çıkmasına olanak sağlar. Bu şekilde anaerobik kavanozda oksijen azalırken CO_2 miktarı artar.

Anaerobik kavanoza Petri kutuları yerleştirildikten sonra anaerotest şeridine 1 damla su damlatılır ve şerit kavanozdaki özel bölmeye koyulur. Anaerocult A poşetine 35 mL su ilave edilip baskılı yüz Petri kutularına dönük olacak şekilde kavanoza yerleştirilir ve kavanoz kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 kutu Anaerocult A içinde 10 poşet vardır.

Anaerocult C (Merck 1.16275)

Mikroaerofilik/ kapneik bakterilerin anaerobik kavanozdaki özel atmosferik koşullarda inkübasyonu için kullanılan poşettir. Özel formülasyonu ile literatürde önerildiği şekilde anaerobik kavanoz içinde hacim olarak %8-10 CO_2 ve %5-6 oksijen son konsantrasyonu sağlar. Katalist kullanılan diğer sistemlerden farklı olarak açığa çıkan enerji az olduğu için kavanozda istenmeyen sıcaklık yükselmesi olmaz ve böylece mikroorganizmaların zarar görmesi engellenir.

Petri kutuları anaerobik kavanoza yerleştirildikten sonra Anaerocult C poşeti yavaşça sallanır ve poşet üzerindeki yazılı kısım üzerine 6 mL su ilave edilip anaerobik kavanoza yerleştirilir. Anaerobik kavanoz kapağı kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 kutu Anaerocult C içinde 25 poşet bulunur.

Anaerocult A mini (Merck 1.01611)

4 Petri kutusunun anaerobik inkübasyonu için kullanılır. Petri kutuları özel torbaya yerleştirildikten sonra Anaerotest şeridi 1 damla su ile ıslatılıp test kısmı Petri kutusu ve/veya başka bir yere deymeyecek şekilde yerleştirilir. Anaerocult A mini üzerine 8 mL su ilave edilip torbaya konulur ve Anaeroclip ile torbanın ağzı kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 paket Anaerocult A mini içinde 25 Anaerocult A poşeti ve 25 özel inkübasyon torbası vardır.

Anaerocult P (Merck 1.13807)

1 Petri kutusunun anaerobik inkübasyonu için kullanılır. Petri kutuları özel torbaya yerleştirildikten sonra Anaerotest 1 damla su ile ıslatılıp test kısmı Petri kutusu ve/veya başka bir yere değmeyecek şekilde yerleştirilir. Anaerocult P mini üzerine 3 mL su ilave edilip torbaya konulur ve Anaeroclip ile torbanın ağzı kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 paket Anaerocult P içinde 25 Anaerocult P poşeti ve 25 özel inkübasyon torbası vardır.

Anaerocult C mini (Merck 1.13682)

Mikroaerofilik/kapneik bakterilerin özel inkübasyon koşullarını 4 Petri kutusunun yerleştirildiği özel torba içinde sağlayan sistemdir. 3 mL su ile ıslatılan poşet içinde Petri kutularının bulunduğu özel torbaya yerleştirilip torba ağzı Anaeroclip ile kapatılır ve istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. 1 paket Anaerocult C mini içinde 25 Anaerocult C mini poşeti ve 25 özel inkübasyon torbası vardır.

Anaerocult IS (Merck 1.16819)

2 adet mikrotiter plate veya 1 adet identifikasyon kitinin anaerobik inkübasyonu için kullanılır. 6 mL su ile ıslatılan poşet, su ile ıslatılmış Anaerotest ve mikrotiter plate veya identifikasyon kiti olan özel torbaya yerleştirilir. Torba ağzı Anaeroclip ile kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır.

Anaerotest (Merck 1.15112)

Anaerotest, inkübasyonda kullanılan kapalı kaplarda anaerobik atmosferin kontrolü için kullanılan test şeritleridir. Test şeridinin mavi bölümü metilen mavisi içerir. Bu boya oksijen varlığında okside olarak mavi renk taşırken oksijensiz ortamda boyanın yükseltgenmesi sonunda renk beyazlaşır. Bu reaksiyon dönüşümlü olduğu için oksijen ile temasında bir kez daha mavileşir.

Reaksiyon, şeridin mavi kısmına 1 damla su damlatılması ile başlar. Mavi zon anaerobik atmosfer kontrolü yapılacak inkübasyon kabına (anaerobik kavanoz ya da torba) serbest atmosfere temas edecek şekilde yerleştirilmeli, Petri kutusu ya da diğer yüzeylere değmemelidir.

Anaerotest şeritleri mikroaerofilik/ kapneiklerin inkübasyon ortamında kalan kısmi oksijen varlığı nedeni ile bu grup mikroorganizmaların inkübasyonu için

uygun atmosfer ortamı sağlayan Anaerocult C ve Anaerocult C mini sistemleri ile birlikte kullanılamaz.

Bir pakette 50 şerit vardır. Dolayısı ile 50 anaerobik inkübasyon ortamı kontrolünde kullanılır. İnkübasyon sırasında şeridin beyaz olması anaerobik atmosfer varlığını gösterir.

Anaeroclip (Merck 1.14226)

Anaeroclip, Anaerocult A mini, P, IS ve C mini ile kullanılan anaerobik torbaların mekanik olarak kapatılmasını sağlayan özel kıskaçtır. Bu kapatma çubuğu sayesinde bu torbaların kapatılması için diğer kapatma sistemlerine gerek kalmaz. Anaeroclip kıskaçları defalarca kullanım sağlayacak materyalden yapılmıştır. 1 pakette 25 kapatma çubuğu bulunur.

Anaerobik Kavanoz (Merck 1.16387)

2,5 L kapasiteli, anaerotest şeritleri için özel bölmesi olan 9-10 cm çaplı standart 12 Petri kutusu alabilen kavanozdur. Sadece kavanoz gövdesi ve kapaktan ibaret olması kolay kullanım özelliği sağlar. Oksijen mekanik olarak değil, kimyasal olarak uzaklaştırıldığı için sistemde manometre ve gaz muslukları kullanımına gerek duyulmamıştır. Yüksek kaliteli materyalden imal edilmiş olması kavanozda sızdırmazlığı tam olarak sağlar.

Petri Sepeti (Merck 1.07040)

Anaerobik kavanoza Petri kutularının yerleştirilmesi için kullanılan tel sepettir. 9 cm çaplı standart 12 Petri kutusunu alacak şekilde dizayn edilmiştir.

15.05.02. Reinforced Clostridial Agar (Merck 1.05410)

EP, USP ve JP'ye uygundur. Anaeropların analizinde kullanılan dehidre besiyeri 50 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH'sı 6,8±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahverengindedir. Gram negatif refakatçi florayı baskılamak için gerekirse 0,02 g/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş polymyxin B sulfate, otoklav çıkışı 45-50 ºC'a soğutulmuş besiyerine ilave edilir. Bu besiyeri gıdalar, klinik numuneler ve diğer materyaldeki *Clostridium*, diğer anaeroplar ve fakültatif anaeropların geliştirilmesi ve sayılması içindir. Amaca uygun olarak materyal ekim öncesi pastörize edilebilir. Ekim genellikle dökme kültür şeklinde yapılır ve anaerobik inkübasyon uygulanır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 10 L besiyeri hazırlanabilir.

15.05.03. Sulfite Iron Agar Base (Merck 1.10864)

ISO 15213'e uygundur. Dehidre besiyeri 40,5 g/L olacak şekilde kaynatılarak saf su içinde eritilir, otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav çıkışı yaklaşık 45-50 ºC'a soğuduğunda yine otoklavda sterilize edilmiş %7 demir (II) sülfat çözeltisinden 20 mL/L olacak şekilde eklenir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı, sarımsı yeşildir ve pH'sı 25 ºC'ta 6,9±0,2'dir. Materyalin pastörizasyonundan sonra kalan sporlar germine olur ve bunlardan hidrojen sülfür pozitif olanlar sülfiti sülfüre indirgerler ve oluşan demir sülfür, siyah koloniler oluşmasını sağlar. Hidrojen sülfür zayıf pozitif bakteriler ise kahverengi koloni oluştururlar. *Clostridium* spp. anaerobik inkübasyon koşullarında siyah koloni yaparlar. 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 12,3 L bazal besiyeri hazırlanabilir.

15.05.04. Reinforced Clostridial Medium (Merck 1.05411)

EP, USP ve JP'ye uygundur. Dehidre besiyeri 38 g/L olacak şekilde saf su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp, otoklavda 121 ºC'ta 15 dk süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH'sı 6,8±0,2'dir. Gram negatif refakatçi florayı baskılamak için gerekirse 0,02 g/L olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş polymyxin B sulfate otoklav çıkışı oda sıcaklığına soğutulmuş besiyerine ilave edilir. Bu besiyeri gıdalar, klinik numuneler ve diğer materyaldeki *Clostridium*, diğer anaeroplar ve fakültatif anaeropların geliştirilmesi ve sayılması içindir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Amaca uygun olarak materyal ekim öncesi pastörize edilebilir. Ekimden sonra tüplerin üzerine ~1 cm kalınlıkta (~2 mL) steril katı parafin ilave edilir ya da anaerobik inkübasyon uygulanır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 15,1 L besiyeri hazırlanabilir.

15.05.05. Fluid Thioglycollate Medium (Merck 1.08191)

EP, USP, JP, APHA, FDA-BAM ve ISO 79367'ye uygundur. Anaeropların geliştirilmesinde kullanılır. Dehidre besiyeri 30 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk süre ile sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. 25 ºC'ta pH'sı 7,1±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki indirgeyici bileşikler olan thioglycollate ve cystine, zor gelişen anaeroplar için dahi yeterli bir anaerobik ortam sağlar. Bu bileşiklerin sülfidril grupları arsenik, cıva ve diğer ağır metalleri inaktive ettikleri için bu besiyeri ağır metaller ile yoğun kontamine olmuş gıdaların ya da ağır metallerin koruyucu olarak kullanıldığı gıdaların analizine de uygundur. Bileşimdeki yoğun vizkozite oksijenin hızlı alımını engellerken redoks indikatörü olan sodyum resazurin, oksijenin yüksek konsantrasyona erişmesini besiyerinin berrak sarı rengini kırmızıya dönüştürmesi ile belirtir. Bu besiyeri her zaman taze hazırlanmalı ve besiyerinde kaynatma ile uzaklaşmayan pembelik varsa kullanılmamalıdır. İnokülasyonda anaerobik ortamın daha güvenli sağlandığından emin olunmak için aşılama, tüpün dibine doğru yapılmalıdır.

Anaerobik ortamın sağlanmasını güvenceye almak üzere inokülasyondan sonra tüpün üzerinin ~1 cm kalınlıkta olacak şekilde (~2 mL) steril katı parafin ya da su agar ile örtülmesi tavsiye edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 16,6 L besiyeri hazırlanabilir.

15.05.06. Thioglycollate Broth (Merck 1.08190)

EP, USP ve APHA'ya uygundur. Anaeropların geliştirilmesinde kullanılır. Dehidre besiyeri 29 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'ta 15 dk süre ile sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. 25 °C'ta pH'sı 7,1±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki indirgeyici bileşikler olan thioglycollate ve cystine, zor gelişen anaeroplar için dahi yeterli bir anaerobik ortam sağlar. Bu bileşiklerin sülfidril grupları arsenik, cıva ve diğer ağır metalleri inaktive ettikleri için bu besiyeri ağır metaller ile yoğun kontamine olmuş gıdaların ya da ağır metallerin koruyucu olarak kullanıldığı gıdaların analizine de uygundur. Bu besiyeri her zaman taze hazırlanmalıdır. Anaerobik ortamın sağlanmasını güvenceye almak üzere inokülasyondan sonra tüpün üzerinin ~1 cm kalınlıkta olacak şekilde (~2 mL) steril katı parafin ya da su agar ile örtülmesi tavsiye edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 17,2 L besiyeri hazırlanabilir.

15.06. Maya ve Küfler

15.06.01 Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar (DRBC) (Merck 1.00466)

ISO 21527 ile FDA-BAM yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri 31,6 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk süre ile sterilize edilir. Otoklav çıkışı yaklaşık 50 °C'a soğuduğunda Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri pembe renklidir ve 25 °C'ta pH'sı 5,6±0,2'dir. Buzdolabı koşullarında ve karanlıkta 1 hafta depolanabilir. Bu nedenle gereğinden fazla hazırlanmamalıdır. Rose bengal chloramphenicol (RBC) agarın (Merck 1.00467) modifiye edilmiş şeklidir. Bileşimine dichloran ilave edilmiş, pH düşürülmüş ve rose bengal konsantrasyonu yarıya indirilmiştir. Bu şekilde mayalar ve bakteriler için daha iyi bir inhibisyon ve küf kolonilerinin yayılması önlenerek sayımın daha iyi yapılması sağlanır (bknz⇒ Ek B02). Buna karşılık, bazı küfler bu besiyerinde gelişemeyebilir. Bu nedenle toplam küf florasının belirlenmesi için paralel olarak rose bengal chloramphenicol (RBC) agar besiyerinin de kullanılması önerilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 15,8 L besiyeri hazırlanabilir.

15.06.02. Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) (Merck 1.00465)

ISO 21527 ile FDA-BAM yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri 31,6 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak eritilir, üzerine 175 mL gliserol ilave edilip, tekrar karıştırılır ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 °C'ta pH'sı 5,6±0,2'dir. Otoklav çıkışında 45-50 °C'a soğuyan besiyeri, Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı olup, 2-8 °C'ta ve karanlıkta olmak üzere 1 hafta depolanabilir. Bu nedenle gereğinden fazla hazırlanmamalıdır. Bileşimdeki chloramphenicol bakterilerin gelişimini baskılar. İlave edilen gliserol ise su aktivitesini 0,99'dan 0,95'e düşürür ve böylece kserofil küflerin gelişimi sağlanır. Bu besiyeri özellikle kuru ve yarı kuru gıdalardaki kserofil küflerin sayımı ve/veya aranması için kullanılır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyerinden (gliserol ilave edilmiş şekli ile) 18,59 L besiyeri hazırlanabilir.

15.06.03. Potato Dextrose Agar (Merck 1.10130)

APHA ve USP yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri 39 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak eritilir, 121 °C'ta otoklavda 15 dk sterilize edilir ve steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı-kahve renklidir ve buzdolabında 2 ay depolanabilir. Otoklav sonrası 25 °C'ta pH'sı 5,6±0,2'dir. Asitlendirme isteniyor ise (pH ~3,5) 1 L besiyerine sıcaklığı 45-50 °C'a düştüğünde tercihen filtre ile ya da otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilmiş %10 tartarik asitten 14 mL ilave edilir. Asitlendirilmiş besiyeri tekrar eritilemez. Analiz edilecek numunede refakatçi flora olarak bakteri yükü fazla değilse ve/veya önemli değil ise PDA besiyeri asitlendirilmeden de kullanılabilir (bknz⇒ Ek B03). 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,8 L besiyeri hazırlanabilir.

15.06.04. YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) Agar (Merck 1.16000)

Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF) yönergelerine uygundur. Dehidre YGC Agar besiyeri 40,0 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 °C'ta pH'sı 6,6±0,2'dir. Otoklav çıkışı besiyeri 45-50 °C'a soğuduğunda steril Petri kutularına dökülür. IDF tarafından süt ve ürünlerinde maya ve küf sayımı için önerilmektedir. Besiyeri bileşimindeki chloramphenicol, bakteri gelişmesini engeller. Hazırlanmış besiyeri serin yerde olmak kaydı ile 1 ay depolanabilir (bknz⇒ Ek B04). Merck YGC agar besiyerinde antibiyotik olarak etki yapan chloramphenicol, dehidre besiyeri içine ilave edilmiş olduğu için hazırlama sırasında ilave bir katkı yoktur. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsıdır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 L besiyeri hazırlanabilir.

15.07. Toplam *Enterobacteriaceae*

15.07.01. Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar (Merck 1.10275)

ISO 21528 ile EP, USP ve JP yönergelerine uygundur. Violet red bile glucose (VRBG) agar olarak da bilinir. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. "Eritme" fonksiyonuna sahip otoklavlar da bu amaçla kullanılabilir, ancak standart sıcak su banyosu bu amaca uygun değildir. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. 500 mL erlen içinde 250 mL saf suyun otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilip besiyerinin bu erlende hazırlanması önerilir. Dehidre besiyeri 39,5 g/L olacak şekilde hazırlanır. Isıl işlem sonrası 40-45 °C'a soğuyunca steril Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 °C'ta pH'sı 7,3±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri parlak ve koyu kırmızı-kahve renklidir. Besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole, başta Gram pozitifler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini inhibe ederken glikoz pozitif bakterilerin varlığı, pH indikatörü ile koloni renginin kırmızıya dönüşmesi ve safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile belirlenir. Dolayısıyla 30-32 ya da 35-37 °C'ta 18-24 saat süren inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler *Enterobacteriaceae* üyeleri olarak sayılır. *Aeromonas* gibi *Enterobacteriaceae* üyesi olmayan bazı refakatçi bakteriler de benzer reaksiyon verir. Buna bağlı olarak rasgele seçilmiş 5 tipik kolonin oksidaz testi ile doğrulanması önerilir. *Enterobacteriaceae* üyeleri oksidaz negatiftirler. Genel olarak ekimden sonra 15 dk oda sıcaklığında kendi halinde bekletilen Petri kutularına ikinci kat olarak yine VRBD besiyerinden 8-10 mL kadar dökülüp, katılaştıktan sonra inkübasyon önerilmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,6 L besiyeri hazırlanabilir.

15.07.02. OF Bazal Medium (Merck 1.10282)

FDA-BAM yönergelerine uygundur. In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde bağırsak kökenli Gram negatif bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında bazal besiyeri olarak kullanılır. Dehidre besiyeri 11,0 g/L olacak şekilde saf su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 50 °C'a soğuduğunda filtre ile sterilize edilmiş %10'luk D(+) glikoz, laktoz, sakkaroz veya başka bir karbohidrat çözeltisinden 100 ml/L olacak şekilde ilave edilir, karıştırılır ve standart tüplere 5 cm yükseklikte dağıtılır. Besiyeri katılaştıktan sonra test edilecek kültürden aşı iğnesi ile 2 ayrı tüpe ekim yapılır. Tüplerden birisinin üzerine 1 cm kalınlığında steril sıvı parafin (paraffin viscous) dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak, koyu yeşilden mavi-yeşile dönen renktedir ve 25 °C'ta pH'sı 7,1±0,2'dir. Besiyerine ilave edilen karbohidratlar, bakteriler tarafından parçalanarak asitlere dönüştürülür ve besiyeri bileşimindeki pH

indikatörü olan bromothymol blue sarıya dönüşmesi pozitif sonuçtur. Karbohidratların indirgenme reaksiyonu, aerobik ya da anaerobik ortamda oluşabilir. Buna göre tüplerdeki renk değişim bölgesine (tüp yüzeyi ya da dibi) bakılarak mikroorganizmaların oksijen kullanımı belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 45,4 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08. Koliform Grup Bakteriler, Fekal Koliformlar ve *E. coli*

15.08.01. VRB (Violet Red Bile Lactose) Agar (Merck 1.01406)

ISO 4832 ile FDA-BAM ve APHA yönergelerine uygundur. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. "Eritme" fonksiyonuna sahip otoklavlar da bu amaçla kullanılabilir, ancak standart sıcak su banyosu bu amaca uygun değildir. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. 500 mL erlen içinde 250 mL saf suyun otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilip besiyerinin bu erlende hazırlanması önerilir. Dehidre besiyeri 39,5 g/L olacak şekilde hazırlanır. Isıl işlem sonrası 40-45 ºC'a soğuyunca steril Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,3±0,2'dir. Bu besiyeri çeşitli standartlarda crystal violet neutral red bile lactose agar ve VRBL (violet red bile lactose) agar adı ile de anılır. ISO 4832, FDA ve daha pek çok uluslararası standarda uygun olarak koliform grup analizinde kullanılır. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,4±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri parlak ve kırmızı-kahve renklidir. Besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole başta Gram pozitifler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini inhibe ederken laktoz pozitif bakterilerin varlığı pH indikatörü ile koloni renginin kırmızıya dönüşmesi ve safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile belirlenir. Dolayısıyla 30-32 ya da 35-37 ºC'ta 18-24 saat süren inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler *Enterobacteriaceae* üyelerinin laktoz pozitif üyeleri olan koliform grup bakteriler olarak sayılır (bknz⇒ Ek B05). Enterokoklar ve koliform grup dışındaki *Klebsiella* türleri bu besiyerinde toplu iğne başı büyüklüğünde küçük pembe koloniler oluştururlarken laktoz negatif olan *Enterobacteriaceae* üyeleri renksiz koloniler meydana getirirler. Laktozdan başka şeker içeren ve özellikle sıvı gıdaların doğrudan ekiminde *Enterobacteriaceae* üyelerinin koliform grup dışında olanları başta olmak üzere bazı bakteriler atipik koloniler oluşturabilir. Atipik koloniler Brilliant Green Bile (BGB) Broth besiyerine aşılanarak gaz oluşumu izlenmelidir. 500 g olan 1 kutu dehidre VRB Agar besiyeri ile 12,6 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.02. Lauryl Sulfate Tryptose (LST) Broth (Merck 1.10266)

ISO 4831, ISO 7251 ile FDA-BAM ve APHA yönergelerine uygundur. Koliform grup bakterilerin EMS yöntemi ile sayılması için önerilen besiyeridir. Lauryl sulfate broth, lauryl sulfate tryptose adları ile de bilinir. Dehidre besiyeri tek kuvvet için 35,6 g/L ve çift kuvvet için 71,0 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH 6,8±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan lauryl sulfate refakatçi floranın gelişimini baskılarken yüksek düzeyde bulunan besin maddeleri ve fosfat tampon "laktozu yavaş kullanan" koliform bakterilerin dahi hızlı gelişimini ve fazla miktarda gaz çıkışını sağlar. İnkübasyon sonunda gelişme saptanan tüplerde gaz çıkışı Durham tüplerinde gaz birikmesi ile belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyerinden tek kuvvette 14,0 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.03. Brilliant Green Bile Lactose (BGB) Broth (Merck 1.05454)

ISO 4831 ve ISO 4832 başta olmak üzere pek çok uluslararası standartta koliform grup doğrulama besiyeri olarak kullanıldığı gibi bazı standartlarda koliform bakterilerin var/yok testinde zenginleştirme besiyeri olarak da kullanılmaktadır. Bu besiyeri brilliant green bile lactose broth, brilliant green bile lactose broth 2% ve BRILA broth isimleri ile de bilinir. Dehidre besiyeri 40,0 g/L olacak şekilde gerekire hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,2±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renktedir. Buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan brilliant green ve safra tuzları refakatçi floranın gelişimini baskılarken, koliform grup bakteriler laktozdan gaz oluşturarak gelişirler (bknz⇒ Ek B07). Laktozdan gaz oluşumu Durham tüpünde biriken gaz ile belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.04. Chromocult Coliform Agar; CCA (Merck 1.10426)

ISO 9308 ile EPA yönergelerine uygundur. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. "Eritme" fonksiyonuna sahip otoklavlar da bu amaçla kullanılabilir, ancak standart sıcak su banyosu bu amaca uygun değildir. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. 500 mL erlen içinde 250 mL saf suyun otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilip besiyerinin bu erlende hazırlanması önerilir. Dehidre besiyeri 26,5 g/L olacak şekilde hazırlanır. Isıl işlem sonrası 40-45 ºC'a soğuyunca steril Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 6,8±0,1'dir. Besiyerinde oluşabilecek bulanıklık, besiyeri

performansını etkilemez. Hazırlanmış besiyeri opalesent (meneviş, yanardöner) ve sarımsı renktedir ve buzdolabında ışık almayacak şekilde ve kurumayı önlemek üzere streç film ile sarılarak 6 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan seçilmiş peptonlar, piruvat ve fosfat tampon, ağır hasar görmüş koliform bakterilerin kendilerini onarmalarını sağlarken tergitol-7, Gram pozitiflerin ve bazı Gram negatiflerin gelişimini baskılar. Koliform grup bakteriler için karakteristik olan ß-D-galactosidase enzimi Salmon-GAL kromojenik substratını parçalayarak koliform bakterilerin pembemsi kırmızı koloni oluşturmasını sağlar. Bileşimdeki X-Glucuronide substratı ise *E. coli* için karakteristik olan ß-D-Glucuronidase enzimi tarafından parçalanır. Böylece *E. coli*, koliform bakteri olarak Salmon-GAL'i parçalaması yanında X-Glucuronide substratını da parçalayarak diğer koliform bakterilerden koyu mavi-menekşe renkli koloni oluşturması ile ayrılır (bknz⇒ Ek B07). Besiyeri bileşimindeki triptofan varlığı doğrudan koloni üzerinde indol testi yapılmasına izin verir. CCA besiyerinde diğer Gram negatifler renksiz koloni oluştururlar. Bunlardan bir kısmı ß-D-Glucuronidase aktivitesi nedeni ile açık mavi-turkuaz renkli koloniler meydana getirirler. Gıda analizlerinde özellikle *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türleri başta olmak üzere yoğun bir refakatçi flora kontaminasyonu var ise kaynatarak yapılan sterilizasyon sonrasında besiyeri 45-50 ºC'a soğutulup cefsulodin ilavesinin besiyerinin selektivitesini artıracağı belirtilmektedir. İlave edilecek cefsulodin miktarı yayma ve dökme yöntemleri ile ekim yapıldığında 5 mg/L ve membran filtre ekimlerinde 10 mg/L olmalıdır. 5 (ya da 10) mg cefsulodin, 1 mL saf su içinde çözülerek 1 L besiyerine ilave edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 18,8 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.05. Readycult Coliforms (Merck 1.01298)

Bileşimi, Fluorocult LMX broth ile aynıdır. Bir diğer deyiş ile Fluorocult LMX broth, analiz edilecek 100 mL suya doğrudan ilave edilecek şekilde özel ambalajında 1,7 g tartılmış ve ışınlanarak sterilize edilmiştir. Su analizinde koliformlar ve *E. coli* varlığını/ yokluğunu belirlemek için kullanır. Bu nedenle analizin yapılacağı kabın önceden sterilize edilmiş olması gereklidir. Aynı şekilde su numunesine besiyeri ilave edilirken gerekli hijyenik kurallara uyulmalıdır. Ambalaj içeriği analiz edilecek suya ilave edilip iyice karıştırılır ve doğrudan 35-37 ºC'ta 18-24 saat inkübe edilir. Besiyeri bileşimindeki lauryl sulfate refakatçi florayı inhibe ederken kromojenik substrat X-GAL koliform bakterilerin, MUG ise O157:H7 dışındaki *E. coli* serotiplerinin belirlenmesinde kullanılır. İnkübasyon sonrası besiyerinin tümünün ya da sadece üst kısmının mavi-yeşil renge dönüşmesi koliform grup bakteri pozitif olarak değerlendirilir (bknz⇒ Ek B08). Koliform grup pozitif bulunan örneklere daha sonra UV lambası ile (Merck 1.13203) floresan testi yapılır. Floresan ışıma *E. coli* biyotip 1 varlığını gösterir. Besiyeri bileşimindeki triptofan varlığına bağlı olarak istenirse floresan pozitif numunelerde indol testi yapılarak *E. coli* biyotip 1 varlığı kesinleştirilmiş olur (bknz⇒ 06.04.03.01. İndol Testi bölümü). Floresan (MUG) negatif numunelerde indol testi yapılır ve pozitif sonuç alınırsa analiz edilen su numunesinde *E. coli*

O157:H7 serotipi varlığından şüphe edilir. Floresan negatif numunede bu şüphe ile indol testi yapılmak istenirse, önce steril bir kaba 2-3 mL kadar numune ayrılıp sonra indol testi yapılmalıdır. İndol testi uygulanmış kültürden, bakteri izolasyonu yapılamaz.

Bu besiyeri 20 analizlik paketler halindedir. Readycult Coliforms besiyerinin 50 mL su analizi için olan şekli de vardır (Merck 1.01295).

15.08.06. Fluorocult LMX Broth (Merck 1.10620)

Özellikle su analizlerinde kullanılır. Tek kuvvette 17,0 g/L; çift kuvvette 34,0 g/L olacak şekilde dehidre besiyeri gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renktedir. 25 °C'ta pH'sı 6,8 ±0,2'dir. Oda sıcaklığında 6 ay depolanabilir. 15 °C altında depolanırsa besiyeri performansını etkilemeyen bir çökelti görülebilir. Bileşimde bulunan lauryl sulfate, refakatçi floranın gelişimini baskılarken fosfat tampon koliform bakterilerin hızlı gelişimini sağlar. Bileşimde bulunan 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-ß-D-galactopyranoside (X-GAL), koliform grup bakteriler tarafından parçalanarak besiyerinin mavi-yeşil renk almasını sağlayan bir kromojenik substrattır. Rengi mavi-yeşil olan tüpler 366 nm uzun dalga boylu UV el lambası (Merck 1.13203) ile loş bir ortamda kontrol edilir (bknz⇒ Ek B09). Floresan ışıma görülen tüpler *E. coli* olarak işaretlenir. Tüp içinde aşırı asit gelişimi olur ise floresan ışıma net bir şekilde alınamayabilir. Bu gibi durumlarda tüpe 1 mL 1 N NaOH ilavesi ile floresan belirginleştirilir. Besiyerinde bulunan triptofan sayesinde doğrudan indol testi yapmak mümkündür. Kuşkusuz indol testi sadece floresan ışınım veren tüplere uygulanır ve bu şekilde sahte MUG pozitif sonuçlardan sakınılmış olunur. Floresanın belirginleştirilmesi için tüpe ilave edilen NaOH indol testini etkilemez. Fluorocult LMX Broth besiyerinde Durham tüpü kullanımına gerek olmaması bu besiyerine büyük bir kullanım kolaylığı sağlar. Gıda analizlerinde özellikle Gram pozitif refakatçi flora yoğun ise otoklavlama öncesinde 30 mg/L konsantrasyonda novobiosin ilavesinin besiyerinin selektivitesini artıracağı belirtilmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyerinden tek kuvvette olmak üzere 29,4 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.07. EC Broth (Merck 1.10765)

ISO 7251 ile FDA-BAM yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri 37 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'ta pH 6,9±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı-kahve renktedir. Ekim sonrası tüpler 44 °C'ta 24 (gerekirse 48) saat süre ile inkübe edilir. Bu sürenin sonunda gelişme ve Durham tüplerinde gaz görülen tüpler pozitif olarak işaretlenir ve standart EMS çizelgesinden örnekteki fekal koliform sayısı hesaplanır. 500 g dehidre besiyeri ile 13,5 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.08. Chromocult TBX Agar (Merck 1.16122)

ISO 16649'a göre gıda ve yemlerde *E. coli* analizinde kullanılan dehidre besiyeri 36,6 g/L olacak şekilde kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilip, Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,2±0,2'dir. Buzdolabında ve karanlıkta 1 hafta depolanabilir. Besiyeri bileşimindeki kromojen substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-β-D-glucuronide), *E. coli* serotiplerinde bulunan β-D-glucuronidase enzimi ile bu substratı 5-bromo-4-chloro-3-indolyl ile β-D-glucuronide'e parçalar ve sonuç olarak *E. coli* kolonileri mavi-yeşil renkli olarak görülür (bknz⇒ Ek B10). Refakatçi flora safra tuzlarıyla baskılanır. İnkübasyonun 44 ºC'ta yapılması da refakatçi florayı baskılayan bir başka etkendir. İşlem görmüş gıdalarda *E. coli* analizi için önce 30-37 ºC'ta 4 saat canlandırma işleminden sonra inkübasyon sıcaklığının 44 ºC'a çıkartılması ve 18-20 saat inkübasyon yapılması önerilmektedir. Bu besiyeri membran filtrasyon tekniğinde de başarıyla kullanılmaktadır. ISO 16649 bu besiyerinin dökme kültür yöntemi ile kullanılmasını önermektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 13,6 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.09. Fluorocult VRB (VRB MUG) Agar (Merck 1.04030)

FDA-BAM yönergelerine uygundur. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. "Eritme" fonksiyonuna sahip otoklavlar da bu amaçla kullanılabilir, ancak standart sıcak su banyosu bu amaca uygun değildir. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. 500 mL erlen içinde 250 mL saf suyun otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilip besiyerinin bu erlende hazırlanması önerilir. Dehidre besiyeri 39,6 g/L olacak şekilde hazırlanır. Isıl işlem sonrası 40-45 ºC'a soğuyunca steril Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,4±0,2'dir. VRB Agar+MUG besiyeri "Fluorocult VRB Agar" ticari adı ile de anılmaktadır. Standart VRB Agar besiyerinden farkı, inkübasyon sonrasında koloni oluşturan koliform grup bakteriler arasından uzun dalga boylu UV el lambası ile (Merck 1.13203) floresan ışıma verenlerin (MUG pozitif) *E. coli* biyotip 1 olarak ayrılmasıdır (bknz⇒ Ek B11). Kolonilerin floresan ışımayı dağıtması nedeni ile gerçekte olduğundan daha fazla *E. coli* sayılmasından sakınmak için inkübasyon 18 saati geçmemelidir. Var/yok esaslı testlerde inkübasyon süresi 24 saat olabilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı-kahve renklidir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,6 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.10. Tryptone Water (Merck 1.10859)

ISO ve APHA yönergelerine uygundur. İndol besiyeri adı ile de bilinir. İndol testi için kullanılan dehidre besiyeri 15 g/L olacak şekilde saf suda gerekirse hafifçe ısıtılarak hazırlanır. Tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,3'tür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı olup oda sıcaklığında 2 aya kadar depolanabilir. İnokülasyondan ve 35-37 ºC'ta 24 saat inkübasyondan sonra 1 mL Kovacs' indol ayıracı damlatılarak indol testi yapılır (bknz⇒ Ek B12). *E. coli* indol pozitif bakteridir. Standart *E. coli* analizinde inkübasyon sıcaklığı 44 ºC'tır. 500 g dehidre besiyeri ile 33,3 L besiyeri hazırlanabilir.

15.08.11. Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293)

İndol testi için kullanılan hazır çözeltidir. 100 mL şişe içeriği ile standart olarak 100 test yapılabilir. İndol testi, Fluorocult LST Broth ve Fluorocult LMX Broth ile ReadyCult Coliforms besiyerlerinde doğrudan yapılabilir.

15.08.12. Fluorocult LST (LST MUG) Broth (Merck 1.12588)

DIN 10183 ile FDA-BAM yönergelerine uygundur. LST Broth+MUG besiyeri "Fluorocult LST broth" ticari adı ile de anılmaktadır. Dehidre besiyeri 36,5 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 6,8±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Bileşimde bulunan lauryl sulfate refakatçi floranın gelişimini baskılarken yüksek düzeyde bulunan besin maddeleri ve fosfat tampon "laktozu yavaş kullanan" koliform bakterilerin dahi hızlı gelişimini ve fazla miktarda gaz çıkışını sağlar. Gaz çıkışı Durham tüplerinde gaz birikmesi ile belirlenir. Gaz pozitif olan tüpler koliform grup olarak işaretlenir, bunlar 366 nm uzun dalga boylu UV el lambası (Merck 1.13203) ile loş bir ortamda kontrol edilir. Floresan ışıma görülen tüpler *E. coli* olarak işaretlenir (bknz⇒ Ek B13). Besiyerinde bulunan triptofan nedeni ile doğrudan indol testi yapmak mümkündür. İndol testi, besiyerine 1 mL Kovacs' indol çözeltisi ilavesi ile yapılabilir. Floresanın belirginleştirilmesi için tüpe gerekirse ilave edilen NaOH, indol testini etkilemez. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyerinden 13,6 L besiyeri hazırlanabilir. MUG pozitif tüplerde indol testi çoğunlukla pozitif çıkar ve bu sonuç *E. coli* biyotip 1 varlığını kesinleştirir. İndol testi negatif çıkarsa nadir bulunan *E. coli* biyotip 2 varlığını gösterir. Bir diğer deyişle MUG pozitif sonuç her koşulda *E. coli* varlığını gösterir. Nadir olarak bulunan bazı *Salmonella* ve *Shigella* serotiplerinin de MUG pozitif ve indol negatif sonuç verebileceği 14.08. *E. coli* biyotip 1 bölümünde açıklanmıştır.

15.08.13. UV El Lambası (Merck 1.13203)

MUG reaksiyonunun belirlenmesi için kullanılan 4 W gücünde uzun dalga boyu (366 nm) UV ışını sağlayan el lambasıdır. Diğer amaçlar için kullanılan UV lambaları ve çeşitli cihazlar ile kombine halde bulunan farklı dalga boylarındaki UV lambaları MUG reaksiyonunun belirlenmesinde sıklıkla sahte negatif sonuçlar vermektedir.

15.09. *E. coli* O157:H7 serotipi

15.09.01. mTS Broth with Novobiocin (Merck 1.09205)

ISO 16654 ile FDA-BAM yönergelerine uygundur. Standart tryptic soy (CASO) broth besiyerinde modifikasyon yapılarak hazırlanmıştır, ancak laboratuvarda standart CASO (tryptic soy) broth besiyerine ilaveler yapılarak mTSB besiyeri elde edilemez. 33,0 g/L olacak şekilde saf su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir ve erlenlere 225 mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'ta pH'sı 7,3±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renkte olup, 2-8 °C'ta 6 ay stabilitesini korur. Novobiosin doğrudan bu besiyeri bileşiminde olduğu için otoklav sonrası bir katkı ilavesi söz konusu değildir. Besiyerine standart uygulamada 25 g(mL) gıda maddesi ilave edilip 35-37 °C'ta 18-24 saat ve tercihen çalkalanarak inkübe edilir, buradan alınan 0,1 mL kültür doğrudan ya da seyreltilerek selektif bir katı besiyerine sürülür. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 15,1 L besiyeri hazırlanabilir.

15.09.02. SMAC Agar Base (Merck 1.09207)

ISO 16654, DIN 10167 ve FDA-BAM başta olmak üzere pek çok uluslararası standarda uygundur. Safra tuzları ve kristal viyole Gram pozitif mikrobiyel florayı önemli ölçüde inhibe eder. *E. coli* O157:H7 serotipinin sorbitol negatif olması nedeni ile standart MacConkey agar besiyeri bileşiminden laktoz çıkartılmış, yerine sorbitol ilave edilmiştir. Dolayısı ile sorbitol negatif olan bakteriler bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturur. *E. coli* O157:H7 analizinde doğrudan SMAC agar besiyeri kullanılabilirse de refakatçi floranın yoğun baskılaması sonucunda sahte negatif sonuç alınabilir. Bu nedenle besiyeri genellikle CT katkısı ile desteklenerek kullanılmaktadır. Dehidre besiyeri 51,5 g/L olacak şekilde kaynatılarak saf su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'ta pH 7,1±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir. CT katkısı ilave edilmesi için 1 şişecik katkı üzerine 1 mL steril saf su konulup karıştırılır. Bu miktar 500 mL besiyeri için yeterlidir. Bu nedenle pratik uygulamada SMAC Agar besiyeri 25,8 g/500 mL olacak şekilde hazırlanır. Otoklav sonrasında 45 °C'a soğutulan 500 mL bazal besiyerine 1 şişecik katkı ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Selektif zenginleştirme kültüründen doğrudan ya da seyreltilerek alınan 0,1 mL besiyeri üzerine yayılır, ya da öze ile sürme yapılır. 35-37 °C'ta 24 saat inkübasyon

sonunda sorbitolü kullanamayan *E. coli* O157:H7 ve diğer sorbitol negatif bakteriler renksiz koloni oluştururken (bknz⇒ Ek B14) sorbitol pozitif olanlar pH indikatörü olan nötral red nedeni ile kırmızı renkli koloni oluştururlar. 500 g olan dehidre besiyeri ile 9,7 L besiyeri hazırlanabilir.

15.09.03. SMAC Agar CT Katkısı (Merck 1.09202)

Selektif katkı şişeciğine 1 mL steril saf su ilave edilir ve iyice karıştırılır. Otoklavlanmış ve 45 ºC'a soğutulmuş besiyerinin üzerine eklenir. 1 şişeciğin bileşimi cefixim 0,025 mg ve potasyum tellurit 1,25 mg şeklindedir. Bileşenler refakatçi mikrobiyel florayı önemli ölçüde baskılar.

15.09.04. Singlepath *E. coli* O157 Test Kiti Merck (1.04141)

Singlepath E. coli O157, *E. coli* O157 serotiplerinin hızlı analizi için kullanılan immun akış prensibi ile hazırlanmış immunolojik bir test kitidir. AOAC tarafından onaylanmış ve sertifikalandırılmıştır. Selektif zenginleştirme besiyeri kültüründen cam bir tüpe alınan 1-2 mL hacim ya da CT-SMAC agar gibi selektif bir besiyerinden alınan 3-5 kolooninin 1-2 mL saf su içindeki süspansiyonu, kaynar su banyosunda 15 dk tutulur ve oda sıcaklığına getirilir. Sonra buradan 150 µL alınıp kitin örnek gözüne aktarılıp, oda sıcaklığında 20 dk bırakılır. Bu süre içinde kitin "C" kontrol penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. "T" test penceresinde de oluşan kırmızı şerit, numunede *E. coli* O157 varlığını gösterir (Bknz⇒ Ek A08). Ön zenginleştirme aşamasından sonra toplam 35-40 dk içinde sonucu doğrudan *E. coli* O157 serotipi olarak verdiği için hızlı kit olarak değerlendirilir. Bu kit, CT-SMAC agar besiyerindeki renksiz (sorbitol negatif) kolonilerin *E. coli* O157 olarak doğrulanmasında kullanılabilir ve doğrudan mTS Broth ya da mEC broth zenginleştirme kültürlerinden doğrudan test amacı ile de kullanılabilir. Eğer doğrudan mTS broth ya da mEC broth gibi bir selektif zenginleştirme besiyerinden örnek alınmış ise pozitif sonuç alınan zenginleştirme kültürden CT-SMAC agar besiyerine sürme yapılarak tipik kolonilerin elde edilmesi önerilir. Bu kit ile elde edilen pozitif sonuç, sadece analiz edilen numunede *E. coli* O157 serotipi olduğunu gösterir. Verotoksin belirlenmesi gerektiği unutulmamalıdır. Bir pakette 25 analiz kiti vardır.

Test kiti buzdolabında korunur ve uygulama öncesi oda sıcaklığına getirilir. Poşet açıldıktan en geç 2 saat içinde kit kullanılmış olmalıdır. Test numunesi kitin örnek gözüne aktarıldıktan 25 dk'dan sonra kit kurumaya başlayacağı için okuma yapılmaz.

15.10. Salmonella

15.10.01. Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)

ISO 6579 ile FDA-BAM, IDF, EP ve APHA yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri 25,5 g/L olacak şekilde saf su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir, 500 mL erlenlere 225'er mL olacak şekilde ya da diğer hacimlerde uygun cam malzemeye dağıtılır ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renklidir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH 7,0±02'dir. Besiyeri bileşiminde bulunan fosfat tampon, pH düşmesine karşı özellikle hasar görmüş olan bakterileri korur. Hazırlanmış besiyeri oda sıcaklığında 2 ay depolanabilir.

15.10.02. Rappaport-Vassiliadis Soy (RVS) Broth (Merck 1.07700)

ISO 6579'a uygundur. Dehidre besiyeri 41,8 g/L olacak şekilde saf su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak çözülür, standart deney tüplerine 10'ar mL olacak şekilde dağıtılır ve otoklavda 115 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 ºC'ta pH 5,2±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve koyu mavi renklidir. Buzdolabında en az 7 ay süre ile korunabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan malaşit (malahit) yeşili ve magnezyum klorür derişimleri, benzeri diğer besiyerlerine göre daha azdır. Bu konsantrasyonlar *Salmonella* serotiplerinin 43 ºC'taki inkübasyon sırasında gelişmesini destekleyecek düzeyde tutulmuştur. Aynı amaçla besiyeri bileşiminde soya peptonu bulunmaktadır. pH'nın 5,2 olması bu besiyerinin selektivitesini yükseltir. Besiyerine 40 mg/L olacak şekilde novobiyosin katılmasının selektiviteyi artıracağı belirtilmektedir. Novobiyosin filtre ile sterilize edilip, 45 ºC'a soğutulmuş besiyerine ilave edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 11,9 L besiyeri hazırlanır.

15.10.03. Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTTn) Broth (base) (Merck 1.05878)

ISO 6579'a uygundur. Dehidre besiyeri, 89,5 g/L olacak şekilde saf su içinde eritilir ve hafifçe kaynatılarak sterilize edilir. Bu besiyeri otoklavlanmaz, aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Isıl işlem sonrası bazal besiyeri oda sıcaklığına soğutulur ve 20 mL/L olacak şekilde iyot/ potasyum iyodür çözeltisi ilave edilir. Bu amaçla önce 2 mL saf su içinde 5 g potasyum iyodür tam olarak çözülür, sonra 4 g iyot eklenip, saf su ile 20 mL'ye tamamlanır. İyot/ potasyum iyodür çözeltisi ilave edildikten sonra aseptik koşullara uyularak standart boyda steril tüplere 10'ar mL dağıtılıp tercihen aynı gün kullanılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri pH'sı 8,0±0,2 olup buzdolabı sıcaklığında (2-8 ºC) dört hafta saklanabilir. Depolama sırasında pH hafifçe düşebilir, ancak depolama sırasında pH 7,0 altına düşerse bu besiyeri kullanılmamalıdır. Bazal besiyeri bulanıktır ve yeşil renklidir. Tüpün dibinde $CaCO_3$ kaynaklı beyaz bir çökelti olur. Tetratiyonat, bazal besiyeri bileşimindeki tiyosülfattan, bazal besiyerine kullanım öncesi eklenen iyot çözeltisi üzerinden oluşur. Tetratiyonat, koliform grup bakteriler ve

diğer enterik bakterilerin gelişmesini baskılar. *Salmonella*, *Proteus* ve diğer bazı bakteriler tetratiyonatı indirgedikleri için baskılanmazlar. Tetratiyonatın indirgenmesi sırasında ortaya çıkan sülfürik asit, $CaCO_3$ tarafından tamponlanır. Safra tuzları *Salmonella* gelişmesini kısmen teşvik ederken, refakatçi florayı önemli ölçüde baskılar. Brilliant green ve novobiocin Gram pozitif bakterileri baskılar. 500 g olan bir kutu dehidre besiyerinden 5,5 L bazal besiyeri hazırlanabilir.

15.10.04. Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium (Base) (Merck 1.09878)

ISO 6579'a uygundur. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. "Eritme" fonksiyonuna sahip otoklavlar da bu amaçla kullanılabilir, ancak standart sıcak su banyosu bu amaca uygun değildir. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. Hazırlanması için 15,8 g besiyeri 500 mL saf su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda tutulur. Isıl işlem sonrası 40-45 °C'a soğutulup 1 mL steril saf su ile sulandırılmış olan 1 şişecik MSRV medium selektif katkısı ilave edilir, karıştırılıp steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık mavi renklidir. Karanlıkta 2-8 °C'ta iki haftaya kadar depolanabilir. Hazırlanmış besiyeri pH'sı 25 °C'ta 5,6±0,2'dir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 15,8 L besiyeri hazırlanabilir.

Bu besiyeri, Rappaport-Vassiliadis enrichment brothun yarı katı hale getirilmiş modifiye halidir. *Salmonella* serotiplerinin izolasyonu için hızlı ve duyarlı bir besiyeridir ve ön zenginleştirmeden sonra selektif zenginleştirme aşaması atlanarak doğrudan selektif katı besiyerine ekim yapılarak analiz süresi 1 gün kısaltılmış olur. Refakatçi floradaki diğer bakterilerin hareketliliği magnezyum klorür, malaşit yeşili ve novobiyosin gibi seçici maddelerin yanında 41,5 °C'a yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı ile önemli ölçüde baskılanır. Analizin prensibi *Salmonella* serotiplerinin hareketli olması esasına dayanmaktadır. MSRV besiyerinde hareketsiz olan *S*. Gallinarum ve *S.* Pullorum belirlenemez, ancak bu serotipler halk sağlığı açısından önemsizdir. Hareketli olan serotiplerin kolonileri opak ve haleli şekilde gelişir (bknz⇒ Ek B15).

ISO 6579'e göre ön zenginleştirme besiyerinden (tamponlanmış peptonlu su) ~0,33 µL olacak şekilde 3 damla, MSRV besiyeri içeren Petri kutularına damlatılır. Bu üç damla toplamda 0,1 mL olmalıdır ve besiyeri yüzeyine ayrı ayrı ve birbirinden eşit uzaklıkta olacak şekilde damlatılmalıdır. Ekim yapılmış MSRV besiyeri 41,5 °C'ta 21-27 saat aerobik ortamda inkübasyona bırakılır. Petri kutuları ters çevrilmemelidir. İzin verilen azami inkübasyon sıcaklığının (42,5 °C) aşılmaması için gerekli önlem alınmalıdır. MSRV besiyerinde inkübasyon sonrasında inokülasyon yapılan damlalarının etrafından düzensiz olarak gri-beyaz opak renkte yayılma gösteren koloniler, şüpheli *Salmonella* pozitif sonuç

olarak kabul edilir. Bu kolonilerin en dışından öze ile alınan izolatlar ile standart biyokimyasal/ serolojik yöntemlerle analiz devam eder.

MSRV besiyerinde 24 s inkübasyon sonrasında tipik koloni görülmezse ilave 24 s inkübasyon önerilmektedir.

15.10.05. Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium Selective Supplement (Merck 1.09874)

Her bir şişecik MSRV besiyeri selektif katkısına 1 mL steril saf su eklenerek katkı çözündürülür ve bu katkı 500 mL bazal besiyerine ilave edilir. Her şişecikte 10 mg novobiyosin vardır.

15.10.06. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck 1.05287)

ISO 6579'a uygundur. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. "Eritme" fonksiyonuna sahip otoklavlar da bu amaçla kullanılabilir, ancak standart sıcak su banyosu bu amaca uygun değildir. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. 500 mL erlen içinde 250 mL saf suyun otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilip besiyerinin bu erlende hazırlanması önerilir. Dehidre besiyeri 55,0 g/L olacak şekilde hazırlanır. Isıl işlem sonrası 40-45 ºC'a soğuyunca steril Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,4±0,2'dir.

Kırmızı renkli olan bu besiyeri bileşimindeki tiyosülfat ve demir tuzu ile hidrojen sülfür oluşumu, ksiloz ve/veya laktoz ve/veya sakkarozun kullanımı pH indikatörü olan fenol red ile belirlenir. Lisinin dekarboksilasyonu ile kadeverin oluşması, koloni etrafındaki pH yükselmesine bağlı olarak menekşe renkli bir zon ile görülür. Bu besiyerinin refakatçi flora üzerinde zayıf bir inhibitör etkisi vardır. *Salmonella* kolonileri besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli olurlar (bknz⇒ Ek B16). *Shigella*, *Providencia*, *Pseudomonas* kolonileri de besiyeri ile aynı renkte ve yarı saydamdır ancak bunlarda siyah merkez oluşmaz. Sarı ve sarı zonlu koloniler koliform grup bakteriler, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Proteus* ve *Hafnia* kolonileridir. Ksiloz pozitif olan *Salmonella* Typhosa bu besiyerinde portakal-hafif opak koloni oluşturur. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 9,09 L besiyeri hazırlanabilir.

15.10.07. Singlepath Salmonella (Merck 1.04140)

Singlepath Salmonella, *Salmonella* serotiplerinin hızlı analizi için kullanılan immun akış prensibi ile hazırlanmış immunolojik bir test kitidir. AOAC tarafından onaylanmış ve sertifikalandırılmıştır. Selektif zenginleştirme besiyeri kültüründen cam bir tüpe alınan 1-2 mL kültür ya da XLD agar gibi selektif bir besiyerinden

alınan 3-5 koloninin 1-2 mL saf su içindeki süspansiyonu kaynar su banyosunda 15 dk tutulur ve oda sıcaklığına getirilir. Sonra buradan 150 µL alınıp kitin örnek gözüne aktarılıp, oda sıcaklığında 20 dk bırakılır. Bu süre içinde kitin "C" kontrol penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. "T" test penceresinde de oluşan kırmızı şerit numunede *Salmonella* varlığını gösterir (Bknz⇒ Ek A11). Selektif zenginleştirme aşamasından sonra toplam 35-40 dk içinde sonucu doğrudan *Salmonella* olarak verdiği için hızlı kit olarak değerlendirilir. Bu kit, XLD agar besiyerindeki tipik kolonilerin *Salmonella* olarak doğrulanmasında kullanılabileceği gibi RVS broth ya da MKTTn broth zenginleştirme kültürlerinden doğrudan test amacı ile de kullanılabilir. Eğer doğrudan RVS broth ya da MKTTn broth gibi bir selektif zenginleştirme besiyerinden örnek alınmış ise pozitif sonuç alınan zenginleştirme kültüründen XLD agar besiyerine sürme yapılarak tipik kolonilerin elde edilmesi önerilir. Bu kit ile elde edilen pozitif sonuç, sadece analiz edilen numunede *Salmonella* olduğunu gösterir. Bir pakette 25 analiz kiti vardır.

Test kiti buzdolabında korunur ve uygulama öncesi oda sıcaklığına getirilir. Poşet açıldıktan en geç 2 saat içinde kit kullanılmış olmalıdır. Test numunesi kitin örnek gözüne aktarıldıktan 25 dk'dan sonra kit kurumaya başlayacağı için okuma yapılmaz.

15.10.08. Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)

ISO 6579'a uygundur. Dehidre triple sugar iron agar besiyeri 65 g/L olacak şekilde saf suya ilave edilir, kaynar su banyosunda 5-10 dk tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak besiyerinin iyice erimesi sağlanır. Besiyeri henüz sıvı halde iken standart 16X160 mm tüplere 7'şer mL olarak dağıtılır, ve tüpler 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılır. Bu şekilde tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olmalıdır. Tüpler bu şekilde bekletilir, besiyeri katılaştıktan sonra tüpler strech filim ile sarılarak buzdolabının alt gözünde 2 aya kadar depolanır. Hazırlanmış besiyeri berrak kırmızı renklidir ve 25 °C'ta pH'sı 7,4±0,2'dir. *Salmonella* yüzeyde kırmızı, dipte sarı ve siyah renk oluşturur. Bazen siyah renk sarı rengi kapatacak kadar yoğun olur. Besiyerinde gaz delikleri ve/veya gaz yarıkları *Salmonella* için tipiktir (bknz⇒ Ek B17 ve 06.04.03.16. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testleri). 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 7,69 L besiyeri hazırlanır.

15.10.09. Lysine Iron Agar (Merck 1.11640)

FDA-BAM yönergesine uygundur. Dehidre lysine iron agar besiyeri 32 g/L olacak şekilde saf suya ilave edilir, kaynar su banyosunda 5-10 dk tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak besiyerinin iyice erimesi sağlanır. Besiyeri henüz sıvı halde iken standart 16X160 mm cam tüplere 7'şer mL olarak dağıtılır ve tüpler 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve menekşe renkli olup, 25 °C'ta pH'sı 6,7±0,2'dir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılır. Bu şekilde tüpün

dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olmalıdır. Tüpler bu şekilde bekletilir, besiyeri katılaştıktan sonra yüzeye sürme ve aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır. Lisin, LDC pozitif bakteriler (*Salmonella*) tarafından kadeverine çevrilir. Bu reaksiyon pH indikatörünün menekşe renk vermesine neden olur. Reaksiyon pH 6'dan daha düşük asit ortamda gerçekleşir. Bu nedenle önce glikoz fermantasyonu sonucu ortam asitlenir. Dolayısı ile bu besiyeri glikozu fermente edebilen bakterilerin LDC enzimi varlığını belirlemek için kullanılabilir. LDC enzimi olmayan bakterilerde besiyeri rengi sarı olarak kalır, ancak inkübasyonun uzaması halinde alkalinizasyon gerçekleşerek sahte pozitif sonuçlar alınabilir. Bu nedenle inkübasyon süresi 24 saati geçmemelidir. Birkaç *Proteus morganii* suşu hariç olmak üzere *Proteus* ve *Providencia* ise lisini α-ketocarboxylic asit oluşacak şekilde deamine eder. Bu bileşik ise yüzeyin hemen altında oksijen etkisi ile demirle reaksiyona girerek kırmızımsı kahverengi bir bileşik oluşturur. Hidrojen sülfür oluşumu dipte siyah renk ile belirlenir (bknz⇒ Ek B18). 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 15,6 L besiyeri hazırlanır.

15.10.10. Urea Broth (Merck 1.08483)

FDA-BAM yönergesine uygundur. Dehidre besiyeri 38,5 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir. Membran filtre ile sterilize edilip steril tüplere 3'er mL dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri berrak, portakal renkli ve 25 ºC'ta pH'sı 6,8±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki tek karbon kaynağı üre olup üreyi kullanan bakteriler bu besiyerinde gelişme sonunda amonyak oluşturarak ortamın alkali hale gelmesine neden olur. Bu besiyeri, üre pozitif olan *Proteus* ile üre negatif olan *Salmonella* serotiplerinin ayrılması için kullanılır. 37 ºC'ta 48 saate kadar süren inkübasyon sonunda besiyerinin orijinal portakal kırmızısı rengin sarıya dönüşmesi negatif (*Salmonella*), kırmızıya dönüşmesi pozitif (*Proteus*) reaksiyon olarak değerlendirilir. Üre testi yapılırken 4 adet urea broth besiyeri hazırlanması, bunlardan birincisine bakteri inoküle edilmeden orijinal portakal kırmızısı rengin izlenmesi (şahit), ikincisine şüpheli kültür (test), üçüncüsüne negatif sonuç için üre negatif olan *E. coli*, dördüncüsüne pozitif sonuç için üre pozitif olan *Proteus* spp. inoküle edilmesi ve bu 4 tüpün beraberce inkübasyonu ve renk değerlendirilmesi gerekmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,9 L besiyeri hazırlanır.

15.11. *Cl. perfringens* ve Sülfit İndirgeyen Anaeroplar

15.11.01. Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar Base (Merck 1.11972)

ISO 7937, ISO 14189 ve APHA yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri 42 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak eritilir ve manyetik taş ile birlikte otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Sülfit indirgeyen *Clostridium* spp. sayımı için yumurta sarısı ilavesi gerektiğinde 80 mL/L olacak şekilde steril yumurta sarısı emülsiyonu 50 ºC'a kadar soğutulup su banyosunda tutulan bazal

besiyerine ilave edilir, Manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve steril Petri kutularına dökülür. Bu besiyeri amaca göre yumurta sarısı ilave edilmeden de kullanılmaktadır. *Cl. perfringens* sayımında ise bazal besiyeri 50 °C'a soğutulduktan sonra filtre ile sterilize edilmiş %5'lik D-cycloserine çözeltisinden 10 mL/L olacak şekilde ilave edilip manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık kahve renklidir, 25 °C'ta pH'sı 7,6±0,2'dir. Sikloserin ilave edilmiş besiyeri 4 gün içinde kullanılmalıdır. Bu yöntem uygulandığında inkübasyon, anaerobik koşullarda ve 44 °C'ta 18-22 saat süre ile yapılır. TSC Agar bileşimindeki besin maddeleri *Cl. perfringens* gelişimini desteklerken hidrojen sülfür oluşumu kolonilerin siyahlaşması ile belirlenir (bknz⇒ Ek B19). Sikloserin refakatçi flora gelişimini baskılar. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 11,9 L besiyeri hazırlanabilir.

15.11.02. TSC Agar Katkısı (Merck 1.00888)

Bu katkı, *Clostridium perfringens* katkısı ya da MUP olarak da bilinir. Şişeciğe 3 mL steril saf su ilave edilir ve karıştırılır. Otoklavlanmış ve 50 °C'a soğutulmuş 500 mL TSC agar besiyerine ilave edilir. 1 şişeciğin bileşimi D-cycloserine 200 mg ve 4-methylumbelliferyl-phosphate disodium tuzu 50 mg şeklindedir. Bu katkı kullanıldığında ayrıca D-cycloserine kullanılmasına gerek yoktur. D-cycloserine refakatçi florayı baskılayıp kolonilerin daha küçük kalmasını sağlarken aynı zamanda *Cl. perfringens* kolonilerinin etrafında siyahlaşmaya neden olur. 4-Methylumbelliferyl phosphate (MUP), alkali ve asit fosfataz için florojenik bir bileşiktir. Asit fosfataz *Cl. perfringens* için yüksek düzeyde spesifik olup, MUP'u uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışıma veren 4-methylumbelliferone'a parçalar ve böylece *Cl. perfringens* kolaylıkla belirlenir.

15.11.03. Sulfite Iron Agar Base (Merck 1.10864)

Bakınız; 15.05.03

15.12. *Listeria monocytogenes*

15.12.01. Fraser Listeria Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398)

ISO 11290 ve APHA yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri saf su içinde 55,0 g/L olacak şekilde ve gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri sarımsı kahverenginde, hemen hemen berrak ve 25 °C'ta pH'sı 7,2±0,2'dir. Fraser broth besiyeri inhibitörsüz, yarım kuvvette (1/2) inhibitör ilave edilmiş ve tam kuvvette inhibitör ilave edilmiş olmak üzere üç şekilde kullanılır. İnhibitör ilave edilmeden besiyeri oda sıcaklığında 2 ay saklanabilse de inhibitör ilave edildiğinde aynı gün kullanılmalıdır. İnhibitörsüz Fraser broth, *L. monocytogenes* sayımında seyrelti

hazırlanması ve canlandırma işlemi için kullanılır. Seyreltme amacıyla kullanılacaksa tüplere 9'ar mL dağıtıldıktan sonra sterilize edilmelidir.

Yarım kuvvette Fraser broth hazırlanması için dehidre besiyeri 27,5 g/ 500 mL olacak şekilde saf suda gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Bu besiyeri *L. monocytogenes* aranmasında ön zenginleştirme için kullanılır. Oda sıcaklığına soğuyan 500 mL bazal besiyerine her ikisi de 1'er mL steril saf su içinde çözülmek üzere 1 şişecik amonyum sitrat katkısı ve 1 şişecik selektif katkı ilave edilir. İyice karıştırılıp steril erlenlere aseptik koşullar altında 225'er mL dağıtılır. Tam kuvvette Fraser broth hazırlanması için yine 27,5 g/ 500 mL hazırlanıp sterilize edilen ve oda sıcaklığına soğutulan bazal besiyerine her ikisi de 1'er mL steril saf su içinde çözülmek üzere 1 şişecik amonyum sitrat katkısı ve 2 şişecik selektif katkı ilave edilir. İyice karıştırılıp steril tüplere aseptik koşullar altında 10'ar mL dağıtılır. Bu besiyeri *L. monocytogenes* aranmasında selektif zenginleştirme için kullanılır.

Fraser broth besiyerinde *Listeria* türlerinin optimum gelişme koşulları, yüksek besin maddesi içeriği ve tamponlama kapasitesi ile sağlanmıştır. Refakatçi floranın gelişimi lityum klorür, nalidiksik asit ve akriflavin hidroklorür ile önemli ölçüde baskılanır. *Listeria* türlerinin β-D-glucosidase aktivitesi, eskulin ve amonyum demir (III) sitrat ile belirlenir. Eskulin, β-D-glucosidase enzimi ile eskuletin ve glikoza parçalanır. Eskuletin demir (III) sitrat ile zeytin yeşili-siyah renk veren kompleks yapar. Dolayısıyla besiyeri renginin kararması *Listeria* türlerinin varlığını gösterir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 9 L bazal besiyeri hazırlanabilir.

15.12.02. Fraser *Listeria* Selective Supplement (Merck 1.00093)

Selektif katkı şişeciğine 1 mL steril saf su ilave edilir ve içerik çözündürülür. 1 şişeciğin bileşimi akriflavin 12,5 mg ve nalidiksik asit 10 mg şeklindedir. Selektif katkı, akriflavin ve nalidiksik asidin liyofilize formlarının bir karışımıdır. *Listeria* aranmasındaki selektif zenginleştirme sırasında refakatçi bakterilerin gelişmesini büyük oranda baskılar.

15.12.03. Fraser *Listeria* Ammonium Iron (III) Supplement (Merck 1.00092)

Selektif katkı şişeciğine 1 mL steril saf su ilave edilir ve içerik çözündürülür. 1 şişeciğin bileşimi ammonium iron (III) sitrat 250 mg şeklindedir. Bazal besiyerindeki esculin, *Listeria* türlerinde bulunan β-D-glucosidase ile esculetin ve glikoza parçalanır. Eskuletin, demir (III) ile bağlanarak besiyerinin zeytin yeşili-siyah renk almasını sağlar.

15.12.04. Listeria Selective Agar Base acc. Ottaviani and Agosti (Merck 1.00427)

ISO 11290 ile FDA-BAM ve APHA yönergelerine uygundur. Hazırlanması için 35 g bazal besiyeri 300 mL saf su içinde karıştırılarak çözülüp üzerine 176 mL saf su eklenir ve kaynar su banyosunda sürekli çalkalanarak bileşenlerin tam olarak çözülmesi sağlanır. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. Antibiyotik olan selektif katkı ısıya duyarlıdır. Su banyosunda 47-50 °C'a soğutulan bazal besiyeri üzerine önce aseptik şartlarda 4 mL steril saf su/ etanol (1:1) ile karıştırılan selektif katkı şişeciği eklenir ve iyice karıştırılır. Ardından 47-50 °C'a ısıtılmış 20 mL'lik zenginleştirme katkısı şişeciğinin tümü aseptik şartlarda besiyerine eklenirken hafifçe karıştırılır. Antibiyotik ve zenginleştirme katkılarının eklenmesinden sonra hazırlanmış besiyeri hızla Petri kutularına ~20 mL olacak şekilde dökülür. Hazırlanmış besiyeri opalesent (menevişli, yanardöner) sarımsı renklidir. pH'sı 25 °C'ta 7,2±0,2'dir. Hazırlanmış Petri kutuları 5±3 °C'ta, karanlıkta ve yüzey kuruması önlenmek koşulunda en az 4 hafta depolanabilir.

Besiyeri içeriği zengin olup çok sayıda bakterinin gelişmesine uygun olmasına rağmen içeriğindeki selektif inhibitörler, Gram pozitif ve Gram negatif refakatçi flora ile maya ve küflerin gelişimini baskılar. *L. monocytogenes* ve *L. innocua* neredeyse hiç etkilenmeyen bir gelişim gösterirken, diğer *Listeria* türlerinin gelişimi yavaşlatılabilir (*L. ivanovii*) veya baskılanabilir (*L. seeligeri*). 5-bromo-4-kloro-3-indol-β-D-glikopiranosit ilavesi β-D-glikosidaz pozitif ve negatif bakterilerin birbirinden kolaylıkla ayırt edilmesini sağlar. Tüm *Listeria* türleri β-D-glikosidaz bakteriler olup besiyeri üzerinde mavi-yeşil renkli koloniler oluştururlar. *L. monocytogenes* tespiti için besiyerine L-α-fosfatidil inositol ilave edilir. *L. monocytogenes* virülans faktör olarak adlandırılan fosfatidil inositol fosfolipaz C (PI-PLC) enzimine sahiptir. Fosfolipaz aktivitesi *L. monocytogenes* kolonileri etrafında opak bir zon oluşturur. *L. monocytogenes* dışında sadece *L. ivanovii* fosfolipaz C aktivitesini gösterir (bknz⇒ Ek B20). 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 14 adet 500 mL besiyeri hazırlanabilir.

15.12.05. Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti Selective Supplement (Merck 1.00432)

Selektif katkı şişesine 4 mL 1:1 oranında karıştırılmış steril saf su ve etanol ilave edilip homojen sarı süspansiyon oluşuncaya kadar içerik karıştırılır. 476 mL besiyeri için 1 şişe selektif katkı kullanılmalıdır. Sulandırılıp kullanılamayan katkılar daha sonra kullanılmak üzere depolanamaz.

1 şişeciğin bileşimi amphotericin B 5 mg, ceftazidime 20 mg, nalidixic acid sodium salt ve 76700 U polymyxin B sulphate 20 mg şeklindedir. 1 şişecik,

sulandırılıp 476 mL besiyerine eklendiğinde son konsantrasyon ISO yönergelerine uygundur.

Selektif katkı, liyofilize formdaki dört farklı antibiyotiğin bir karışımıdır. Bunlardan amphotericin B maya ve küf gelişimini büyük ölçüde azaltırken polymyxin B sulphate Gram negatif bakterilerin gelişimini, nalidixic acid sodium salt temel olarak Gram negatif bakterilerin ve bazı Gram pozitif bakterilerin gelişimini baskılarken ceftazidime ise Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde geniş spektrumlu bir antibiyotik etki yapar.

15.12.06. Listeria agar acc. Ottaviani and Agosti Enrichment Supplement (Merck 1.00439)

20 mL olan zenginleştirme katkısı su banyosunda 47-50 °C'a kadar ısıtılır ve selektif katkının ilavesinden hemen sonra bazal besiyerine eklenir. Katkının önceden ısıtılması, ilave sırasında bazal besiyerinde soğumaya bağlı olarak kısmi jelleşme olmasını önlemek içindir. Selektif katkı ilave edildikten sonra hacmi 480 mL olan bazal besiyeri için bu katkının tümü kullanılmalıdır. Besiyeri ile katkının homojen bir şekilde karışması sağlanmalıdır. Zenginleştirme katkısı, 1 g L-α-fosfatidilinositol'ün saf sudaki homojen steril süspansiyonundan oluşmaktadır. *L. monocytogenes*'in diğer *Listeria* türlerinden ayırt edilmesini sağlar. *L. monocytogenes*, virülans faktör olarak adlandırılan fosfatidil inositol fosfolipaz C (PI-PLC) enzimine sahiptir. Fosfolipaz aktivitesine bağlı olarak *L. monocytogenes* kolonileri etrafında opak bir zon oluşur. *L. monocytogenes* dışında sadece *L. ivanovii* fosfolipaz C aktivitesi gösterir.

15.12.07. PALCAM Agar (base) (Merck 1.11755)

Bu besiyeri ISO 11290 ile FDA-BAM ve IDF yönergelerine uygun olarak *L. monocytogenes* aranmasında ve sayılmasında kullanılır. 500 mL saf su içinde 35,9 g bazal besiyeri kaynatılarak çözülür ve otoklavda manyetik taş ile birlikte 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav çıkışı 45 °C'a soğutulup üzerine 1 mL steril saf su içinde çözülmüş 1 şişecik selektif katkı ilave edilir. Manyetik karıştırıcı ile selektif katkı homojen bir şekilde dağıtılıp steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir, 25 °C'ta pH'sı 7,2±0,2'dir. Buzdolabında 2 haftaya kadar depolanabilir.

Besiyeri bileşimindeki antibiyotikler ve lityum klorür ile refakatçi flora olarak bulunan Gram negatiflerin ve çoğu Gram pozitiflerin inhibisyonu sağlanır. *Listeria* türlerinin β-D-glucosidase aktivitesi eskulin ve amonyum demir (III) sitrat ile belirlenir. Eskulin, β-D-glucosidase enzimi ile eskuletin ve glikoza parçalanır. Eskuletin demir (III) sitrat ile zeytin yeşili-siyah renk veren kompleks yapar. Stafilokok ve enterokok gibi mannitol pozitif bakteriler eğer inhibe olmamışlar ise sarı renkli ve sarı zonlu koloni oluştururlar. *L. monocytogenes* bu besiyerinde 1,5-2 mm çapında zeytin yeşili-gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman

siyah zonlu koloni oluşturur (bknz⇒ Ek B21). 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 13,9 L besiyeri hazırlanır.

15.12.08. PALCAM Agar Selective Supplement (Merck 1.12122)

Selektif katkı şişesine 1 mL steril saf su ilave edilir ve içerik çözündürülür. Otoklavlanmış ve 45 °C'a soğutulmuş 500 mL besiyerinin üzerine eklenir. 1 şişeciğin bileşimi polymyxin B sulfate 5 mg, ceftacidim 10 mg ve acriflavine 2,5 mg şeklindedir. İçerikteki antibiyotikler refakatçi florayı baskılar.

15.12.09. Oxford Listeria Selective Agar (base) (Merck 1.07004)

Bu besiyeri ISO 11290 ile FDA-BAM ve IDF yönergelerine göre *L. monocytogenes* aranmasında ve sayılmasında kullanılır. 500 mL saf su içinde 29,25 g dehidre bazal besiyeri kaynatılarak çözülür ve otoklavda manyetik taş ile birlikte 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav çıkışı 45 °C'a soğutulup üzerine 5 mL 1:1 oranında hazırlanmış steril saf su:alkol karışımı içinde çözülmüş 1 şişecik selektif katkı ilave edilir. Manyetik karıştırıcı ile selektif katkı homojen bir şekilde dağıtılır ve steril Petri kutularına dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve mavimsi kahve renkli olup 25 °C'ta pH'sı 7,0±0,2'dir. Buzdolabında 2 haftaya kadar depolanabilir.

Besiyeri bileşimindeki antibiyotikler ve lityum klorür ile refakatçi flora olarak bulunan Gram negatiflerin ve çoğu Gram pozitiflerin inhibisyonu sağlanır. *Listeria*, eskulini β-D-glucosidase enzimi ile eskuletin ve glikoza parçalar. *L. monocytogenes* bu besiyerinde 2-3 mm çapında siyahımsı yeşil kahverengi siyah zonlu çökük merkezli koloni oluşturur (bknz⇒ Ek B22). 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 17 adet 500 mL besiyeri hazırlanabilir.

15.12.10. Oxford Listeria Selective Supplement (Merck 1.07006)

Selektif katkı şişeciğine 5 mL 1:1 oranında steril saf su ve etanol karışımı ilave edilip karıştırılır. 500 mL besiyeri için 1 şişecik selektif katkı kullanılmalıdır. 1 şişeciğin bileşimi cycloheximide 200 mg, colistin sulfate 10 mg, acriflavin 2,5 mg, cefotetan 1 mg ve fosfomycin 5 mg şeklindedir. İçerikteki antibiyotikler refakatçi florayı baskılar.

15.12.11. Singlepath L. mono (Merck 1.04148)

İmmunokromatografik bir test kiti olup, yarı selektif Fraser broth besiyerinde ön zenginleştirme ya da selektif buffered listeria enrichment broth besiyerinde zenginleştirme aşamalarından sonra Singlepath Listeria kiti kullanılarak numunede *Listeria* olup olmadığı kontrol edilir. İnkübasyon sonunda kültürden cam bir tüpe 1-2 mL alınıp kaynar su banyosunda 15 dk tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL Singlepath Listeria kitine uygulanır. 20 dk sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de

kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde *Listeria* olduğunu gösterir (bakınız; Ek A12). Pozitif sonuç alındığında doğrulama için standart bir katı besiyerine sürme yapılıp sonucun doğrulanması önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuç alınırsa analize devam etmenin gereği yoktur. Selektif bir katı besiyerinde tipik kolonilerin *L. monocytogenes* olup olmadığı da bu kit ile kontrol edilebilir. Bu amaçla tipik morfolojideki 4-5 koloni 2 mL steril saf suda çözülür ve zenginleştirme kültüründe uygulanan yöntem ile devam edilir. 1 pakette 25 test kiti vardır.

15.13. *Staphylococcus aureus*

15.13.01. Baird-Parker Agar (base) (Merck 1.05406)

ISO 6888 ile FDA-BAM ve APHA yönergelerine uygundur. 58,0 g dehidre besiyeri 950 mL saf su içinde 1-2 dk kaynatılarak tümüyle çözündürülür ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Bazal besiyeri 45 °C'a soğutulur ve manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılırken üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 mL yumurta sarısı-tellurit (Egg yolk-tellurite) emülsiyonu ilave edilip steril Petri kutularına dökülür. Analiz edilecek numunede *Proteus* kontaminasyonunun yüksek düzeyde olduğundan endişe ediliyor ise otoklav sonrası 50 mg/L konsantrasyonda olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş sulphamethazine ilavesi önerilmektedir. Hazırlanmış besiyeri opalesent (meneviş, yanardöner) sarımsı-kahve renkte olup 25 °C'ta pH'sı 6,8±0,2'dir. Petri kutuları strech filime sarılarak buzdolabının alt raflarında 2 aya kadar depolanabilir. Baird-Parker agar besiyeri refakatçi floranın inhibisyonu için lityum klorür ve tellurit içerirken besiyeri bileşimindeki piruvat ve glisin stafilokokların gelişimini selektif bir şekilde stimüle eder. *Staph. aureus* kolonileri lipoliz ve proteoliz sonucunda koloni etrafında tipik zon ve halka oluşturmaları, telluritin telluriuma indirgenmesi sonucunda siyah koloni oluşturmaları olmak üzere 2 tipik karakteristik özellik ile belirlenirler (bknz⇒ Ek B23). 37 °C'ta 24 saat inkübasyon sonunda *Staph. aureus* 1-1,5 mm çapında siyah, parlak konveks koloniler oluşturur. Koloni çapı 48 saat inkübasyondan sonra 1,5-2,5 mm olur. Yumurta sarısı reaksiyonu ve tellurit indirgenmesi genellikle pozitif koagülaz reaksiyonu ile beraberce oluşur. Baird-Parker agar besiyerinde yumurta sarısı yerine kan plazması ilavesi ile hemoliz testi de yapılabilir. İnsan kaynaklı *Staph. aureus* α-hemoliz yaparken sığır kaynaklı olanlar ß-hemoliz yaparlar. Hemoliz reaksiyonu, besiyerinin 37 °C'ta 24 veya 48 saat inkübasyonu ve sonra oda sıcaklığında veya tercihen buzdolabında 1 gece bırakılması ile daha kesin olarak saptanır. 500 g 1 kutu Baird-Parker agar besiyeri ile 8,6 L besiyeri hazırlanır.

15.13.02. Egg yolk-Tellurite Emulsion (Merck 1.03785)

Baird-Parker agar besiyeri katkısıdır. Egg yolk-tellurit ticari adı ile de bilinir. Kullanmadan önce çökelti olma olasılığına karşı iyice çalkalanmalıdır. Steril bir çözeltidir. Bununla beraber, sterilitesinin kontrol edilmesi tavsiye edilir. Bu amaçla standart şekilde hazırlanmış 1 adet Baird-Parker agar besiyerinin kontrol olarak inkübe edilmesi yeterlidir. 50 mL şişe içeriği doğrudan 950 mL olarak hazırlanan Baird-Parker agar besiyerine ilave edilir. 1 şişeciğin bileşimi steril yumurta sarısı 200 mL, NaCl 4,25 g, potasyum tellurit 2,1 g ve 1 litreye tamamlayacak kadar steril saf sudur.

Sıcaklık farkından dolayı bölgesel jelleşmeleri önlemek için ilave öncesi katkının oda sıcaklığına hatta 35-40 °C'a getirilmesi gereklidir. Günlük uygulamada 1 şişe yumurta sarısı-tellurit emülsiyonunun tümü kullanılmayacak ise kalan kısmın sterilitesinin korunmasına özen gösterilmelidir. Yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu buzdolabı sıcaklığında korunmalıdır.

15.13.03. Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

EDTA ilave edilmiş liyofilize tavşan plazmasıdır. *Staph. aureus* tarafından oluşturulan koagülazın belirlenmesi içindir. İdeal olarak brain-heart broth kültürü kullanılmalıdır. Brain-heart agar kültürü kullanılacak ise koloni 1 mL steril saf su içinde çözülüp kullanılabilir. Liyofilize tavşan plazması 3 mL steril saf su ile sulandırılıp steril küçük tüplere 0,3 mL olacak şekilde dağıtılır ve üzerine 0,1 mL kültür ilave edilip 37 °C'ta inkübasyona bırakılır. Her saat tüpte pıhtılaşma olup olmadığı tüpü yavaşça eğerek kontrol edilir, ancak bu kontrol sırasında tüpün fazla eğilmemesine ve karıştırılmamasına özen gösterilmelidir. Tüpte belirgin pıhtı oluşumu (%75 pıhtı) pozitif olarak değerlendirilir (bknz⇒ Şekil 06.05). 1 pakette 6 adet liyofilize şişe vardır. Her şişe 3 mL steril saf su ile sulandırılıp bundan 0,3 mL'si 1 koloni analizi için kullanılır. Buna göre 1 paket ile 60 test yapılabilir. Koagülaz, kan plazmasını koagüle eden bir enzimdir. *Staph. aureus* tarafından oluşturulan koagülaz ve enterik toksin arasında yakın bir ilişki vardır. Buna göre koagülaz pozitif *Staph. aureus*'un toksin oluşturma yeteneğinde olduğu kabul edilir. Koagülaz negatif reaksiyon veren *Staph. aureus* suşları, gıda mikrobiyolojisini ilgilendirmez.

15.13.04. Giolitti-Cantoni Broth (Merck 1.10675)

ISO 6888 ve APHA yönergelerine uygundur. Dehidre besiyeri tek kuvvette 55 g/L olacak şekilde saf suda gerekirse hafifçe ısıtılarak tümüyle çözündürülüp tüplere 9'ar mL dağıtılır ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renktedir, 25 °C'ta pH'sı 6,9±0,2'dir. Otoklav çıkışında potasyum tellurit çözeltisi ilave edilmeden buzdolabının alt raflarında 2 haftaya kadar depolanabilir. Depolanmış besiyeri kullanılacağı zaman içindeki havanın çıkması için önce kaynar su banyosunda 15 dk kaynatılır. Oda sıcaklığındaki tüplere filtre ile sterilize edilmiş %1 potasyum tellurit trihidrat

çözeltisinden 0,1'er mL eklenir ve bu ekleme yapıldığında besiyeri kullanılmalıdır. Potasyum tellurit zehirli bir maddedir ve bu çözelti çeker ocak içinde hazırlanmalıdır. Giolitti-Cantoni Broth tüplerine 0,1'er mL potasyum tellurit eklenirken pipet asla ağızla değil puar ile kullanılmalı ve bu aktarma işlemi de çeker ocakta yapılmalıdır. Besiyeri bileşimindeki piruvat, glisin ve yüksek konsantrasyondaki mannitol, stafilokokların gelişimini teşvik ederken refakatçi florada bulunan Gram negatifler lityum klorür, Gram pozitifler ise tellurit ile baskılanır. Mikrokokların baskılanması ise kısmen anaerobik inkübasyon ile sağlanır. Stafilokokların gelişimi besiyerindeki telluritin metalik telluriuma indirgenmesi sonunda oluşan siyah renk ile belirlenir (bknz⇒ Ek B24). Giolitti-Cantoni broth besiyeri gıdalarda EMS yöntemi ile *Staph. aureus* sayımı veya analiz edilen gıdanın belirli bir miktarında (hacim veya ağırlık) *Staph. aureus* var/yok testi için kullanılır. Ekimden sonra tüplerin üzerine otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilmiş 2 mL steril sıvı parafin ilave edilerek kısmi bir anaerobik ortam sağlanır. 37 ºC'ta 18-24 saat inkübasyondan sonra siyahlaşma olan tüplerden Baird-Parker agar besiyerine sürme yapılarak sonuçlar doğrulanır.

Besiyeri çift kuvvette hazırlanacaksa 110 g/L olacak şekilde hazırlanır ve tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Bu koşulda tüplere filtre ile sterilize edilmiş %1 potasyum tellurit trihidrat çözeltisinden 0,2'şer mL eklenir.

500 gramlık 1 kutu dehidre Giolitti-Cantoni Broth ile 9,09 L besiyeri hazırlanır.

15.14. *Campylobacter jejuni*

15.14.01. Bolton Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.00068)

ISO 10272'ye göre *Campylobacter* aranmasında kullanılır. Dehidre besiyeri saf su içinde 13,8 g/ 500 mL olacak şekilde ve gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilip otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Oda sıcaklığına geldiğinde 25 mL lize at serumu ve 1 şişecik Bolton broth selektif katkısı ilave edilir, iyice karıştırılıp vida kapaklı steril şişelere dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri koyu kırmızı–siyah renklidir (bknz⇒ Ek B25). 25 ºC'ta pH'sı 7,4±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki besin maddeleri hasar görmüş *Campylobacter* suşlarının canlandırılması için gereklidir. Mikroaerofilik ortamda inkübasyon önerilir. Vida kapaklı şişe kullanılıyor ise mikroaerofilik inkübasyon zorunlu değildir. Refakatçi florada bulunan Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler selektif katkı bileşiminde bulunan vancomycin, cefoperazone ve trimethoprim ile baskılanır. Cycloheximide maya ve küflerin gelişimini engeller. Selektif katkı 1:1 oranında 5 mL steril saf su ve alkol karışımı ile eritilir. Uygulamada 250 mL vida kapaklı şişelere 225'er mL besiyeri dağıtılır ve 25 g(mL) gıda ilave edilir. Bu aşamadan sonra besiyerinin üstü ile kapak arasında en çok 2 cm kalmış olması gereklidir. 37 ºC'ta 4 saat inkübasyondan sonra inkübasyona 41,5 ºC'ta 44 saat devam edilir ve ilk inkübasyonun başlangıcından itibaren 24 ve 48 saatlerde örnek

alınarak *Campylobacter* blood free selective agar (modified CCDA) besiyerine sürme yapılır. Doğrudan Singlepath Campylobacter ile analiz yapmak da mümkündür. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 36,2 L besiyeri hazırlanabilir.

15.14.02. Bolton Broth Selective Supplement according to ISO 10272-1 (Merck 1.00079)

ISO 10272-1'e uygundur. *Campylobacter* analizinde kullanılan Bolton broth için selektif katkıdır. Şişecik, 5 mL 1:1 steril saf su ve etanol karışımında tam olarak çözülür ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilip 45 ºC'a soğutulmuş 500 mL besiyerinin üzerine eklenir. 1 şişeciğin bileşimi vancomycin 10 mg, cefoperazone 10 mg, trimethoprim 10 mg ve amphotericin B 5 mg şeklindedir. Bu katkı, ISO 10272'ye uygun olarak dört farklı antibiyotiği içerir. Bunlardan vancomycin, cefoperazone ve trimethoprim, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin, amphotericin B ise maya ve küflerin gelişmesini önemli ölçüde baskılar. Besiyeri ile katkının homojen bir şekilde karıştığından ve liyofilizatın tam olarak çözünmüş olduğundan emin olunmalıdır.

15.14.03. mCCD (Modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate) Agar Base (Merck 1.00070)

Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar ve *Campylobacter* blood-free selective agar base olarak da bilinen bu besiyeri ISO 10272'ye uygundur. Dehidre besiyeri 22,75 g/ 500 mL olacak şekilde saf suda çözülür, kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 45–50 ºC'a soğutulup 2 mL steril saf su ile çözünmüş CCDA selective supplement ilave edilir. Karıştırılıp steril Petri kutularına dağıtılır. Hazırlanmış besiyeri koyu kahve-siyah renkli olup, 2-8 ºC'ta 2 hafta depolanabilir. 25 ºC'ta pH'sı 7,4±0,2'dir. Bileşime giren maddeler enterik *Campylobacter* suşlarının gelişmesini destekler, selektif katkıdaki antibiyotikler *Enterobacteriaceae* üyeleri ile maya ve küflerin gelişimini baskılar. *Campylobacter* türleri bu besiyerinde küçük ve açık renkli koloni oluşturur (bknz⇒ Ek B26). İnokülasyon öncesinde besiyeri yüzeyi kuru olmalıdır. Aksi halde kolonilerde yayılma görülür. Ancak çok kuru besiyerinde *Campylobacter* gelişemez. İdeal olarak hazırlanmış Petri kutuları bir gece oda sıcaklığında tezgâh üzerinde bırakılarak kurutulmalıdır. İnkübasyon anaerobik kavanozda Anaerocult C kullanılarak ya da özel torbası içinde Anaerocult C mini kullanılarak mikroaerofil ortamda 41,5±1 ºC'ta 24-28 saat süre ile yapılır. İnkübasyon sırasında yüzeyin aşırı kurumasından kaçınılması gerekir. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 10,98 L besiyeri hazırlanabilir.

15.14.04. CCDA Selective Supplement (Merck 1.00071)

Şişeciğe 2 mL steril saf su ilave edilir ve karıştırılır. Otoklavlanmış ve 45 °C'a soğutulmuş 500 mL mCCDA besiyerine 1 şişecik katkı ilave edilir. 1 şişeciğin bileşimi amphotericin B 5 mg ve cefoperazone 16 mg şeklindedir. Bileşimindeki amphotericin maya ve küflerin, cefoperazone ise *Enterobacteriaceae* üyelerinin gelişimini baskılar.

15.14.05. Singlepath Campylobacter (Merck 1.04143)

Bolton brothta standart yöntemle inkübe edilen kültürden cam bir tüpe 1-2 mL alınıp kaynar su banyosunda 15 dk tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde Pastör pipeti ile 5 damla (~160 µL) alınıp Singlepath Campylobacter kitine uygulanır. 20 dk sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde *Campylobacter* olduğunu gösterir (bakınız⇒ Ek A13). Pozitif sonuç alındığında doğrulama için standart bir katı besiyerine sürme yapılıp sonucun doğrulanması önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuç alınırsa analize devam etmenin gereği yoktur.

15.15. *Vibrio parahaemolyticus*

15.15.01. Alkaline Peptone Water (Merck 1.01800)

ISO 21872'ye uygundur. Dehidre besiyeri 20 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içerisinde eritilir. Uygun kaplara 225'er mL olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121°C'ta 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'ta pH'sı 8,5±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı-kahve renklidir. Çok sayıda *Vibrio* türünün gelişmesi besiyeri içerisindeki peptonlar, NaCl ve pH'nın 8,5 olması ile desteklenir. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 25 L besiyeri hazırlanabilir.

15.15.02. Thiosulfate Citrate Bile and Sucrose (TCBS) Agar (Merck 1.10263)

ISO 21872'ye uygundur. Dehidre besiyeri 88 g/L olacak şekilde saf suya ilave edilir, agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutulur ve 45-50 °C'a soğutulup steril Petri kutularına dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşilimsi mavi renktedir, 25 °C'ta pH'sı 8,6±0,2'dir. Yüksek derişimdeki tiyosülfat ve sitrat ile yüksek alkanite *Enterobacteriaceae* üyelerini, ox bile ve cholate ise enterokokları baskılar. Besiyerinde gelişebilen koliform bakteriler sakkarozu fermente edemez. Sadece birkaç sakkaroz pozitif *Proteus* suşu sarı

renkli koloni oluşturabilir. Thymol blue ve bromothymol blue karışık indikatörü, sakkarozdan asit oluşumunu sarı renkli koloni oluşumu ile belirtir. 35 °C'ta 18-24 saat inkübasyondan sonra düz, 2-3 mm çaplı sarı renkli koloniler *Vibrio cholerae*, *Vibrio cholerae* type El Tor olarak, küçük mavi-yeşil merkezli koloniler *Vibrio parahaemolyticus* olarak, büyük sarı koloniler *Vibrio alginolyticus* olarak ve mavi koloniler *Pseudomonas* ve *Aeromonas* olarak izole edilir (bknz⇒ Ek B27). 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 5,6 L besiyeri hazırlanabilir.

15.16. *Cronobacter sakazakii*

15.16.01. Cronobacter Selective Broth (base) acc. ISO 22964 (Merck 1.20597)

CSB adı ile de bilinir. ISO 22964'e uygundur. *Cronobacter* spp.'nin selektif zenginleştirilmesi için kullanılan bir besiyeridir. 500 mL saf su içinde 14,02 g besiyeri gerekirse hafifçe ısıtılarak çözülür, tüplere 10'ar mL olacak şekilde dağıtılır ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Selektif katkı, oda sıcaklığındaki 10 mL bazal besiyeri içeren tüplere 0,02 mL (20 µL) olacak şekilde eklenir. Hazırlanmış besiyeri berraktır ve mor renktedir. Yüksek besin içeriği, *Cronobacter* gelişmesini destekler CSB, sakkaroz fermantasyonuna dayanan diferansiyel sıvı besiyeri olarak tasarlanmıştır. *Cronobacter* spp., besiyerindeki bromocresol indikatörü aracılığıyla genellikle besiyerinin rengini değiştirir. Bu tepkime, *Cronobacter* için belirlenmiş inkübasyon süresi içinde her zaman pozitif sonuç değildir. EN ISO 22964 standardına göre CSB'de renk değişikliğine bakılmaksızın CSB'deki her selektif zenginleştirmeden CCI (Chromogenic Cronobacter isolation) agara alt kültür yapılması gereklidir. 500 g 1 kutu dehidre besiyeri ile 17,8 L besiyeri hazırlanabilir.

15.16.02. Cronobacter Selective Broth (CSB) Selective Supplement (Vancomycin) (Merck 1.20595)

Her şişeciğin bileşimi vankomisin hidroklorür 5 mg şeklindedir. Bu selektif katkı, vankomisin hidroklorürün liyofilize edilmiş formudur ve Gram pozitif refakatçi floranın gelişmesini baskılar. Selektif katkı şişeciğine 1 mL steril saf su ilave edilir ve içerik çözündürülür. Selektif katkı 500 mL olarak hazırlanmış ve 50 °C'ın altına soğutulmuş (tercihen oda sıcaklığı), 10 mL bazal besiyerine 0,02 mL (20 µL) olacak şekilde eklenir. Böylece katkısı ilave edilmiş CSB'de vankomisin derişimi 10 ppm olur. EN ISO 22964'e göre hazırlanmış ve katkısı eklenmiş besiyeri 2-8 °C'ta 1 gün saklanabilir.

15.16.03. CCI (Chromogenic Cronobacter Isolation) agar acc. ISO 22964 (Merck 1.20596)

ISO 22964'e uygundur. *Cronobacter* spp.'nin selektif izolasyonu için kullanılan bir besiyeridir. 29,5 g besiyeri 1 L saf suda kaynatılarak ve sürekli karıştırılarak çözülür. Ardından otoklavda 121ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Besiyeri 45-50 ºC'a soğuduğunda Petri kutularına ~20 mL olacak şekilde dökülür. Hazırlanmış besiyeri berraktır ve sarımsı-kahverengindedir. Kullanımdan önce Petri kutusunda görülebilir nem olmamalıdır. Eğer nem varsa yeterli bir kurutma uygulanmalıdır. Ekim yapılmış Petri kutuları ters çevrilerek aerobik koşullarda EN ISO 22964'te belirtildiği gibi 41,5±1 ºC'ta 22-26 saat inkübe edilir. CCI agarda tipik *Cronobacte*r kolonileri küçük-orta (1-3 mm) büyüklüktedir ve maviden mavi-yeşile değişen renkte gözlenirler. *Cronobacte*r olmayan koloniler ise genellikle beyaz veya yeşil merkezli ya da gri veya siyah renkte de olabilir. *Cronobacte*r olmayan bazı koloniler doğal pigmente sahip olarak sarı veya kırmızı renkte de olabilir. Bu bulgular klasik testlerle, örneğin EN ISO 22964'te tarif edildiği gibi doğrulanmalıdır.

CCI agar, ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirmeden sonra *Cronobacter* spp.'in iyi gelişmesini sağlayan orta derecede besleyici ve selektivite özelliğine sahiptir. İçerdiği sodyum dezoksikolat, Gram pozitif refakatçi floranın gelişimini baskılarken hidrojen sülfür üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinden ayrılmasını sağlar. Bu kromojenik besiyeri, α-glukosidaz enziminin tespiti için kromojenik bir bileşik olan 5-bromo-4-kloro-3-indolil-α-D-glukopiranosid içerir. Bu enzim, bütün *Cronobacter* spp'de bulunur ve tepkime sonucunda besiyerinde gelişen kolonilerin maviden mavi-yeşil renge değişen şekilde görünmelerini sağlar (bknz⇒ Ek B28). EN ISO 22964'e göre hazırlanmış Petri kutuları 2-8 ºC'ta karanlıkta ve nem kaybından korunmak şartı ile 14 güne kadar saklanabilir. 500 g 1 kutu dehidre besiyeri ile 16,9 L besiyeri hazırlanabilir.

15.17. *Bacillus cereus*

15.17.01. Mannitol Egg yolk Polymyxin (MYP) Agar Base (Merck 1.05267)

ISO 7932 ile uyumludur. Bu besiyeri *Cereus* selective agar acc. to Mossel veya MYP (mannitol egg yolk-polymyxin adı ile bilinir. *B. cereus* sayılmasında kullanılır. Bu besiyeri hazırlandıktan sonra ancak 3-4 gün depolanabilir. Günlük uygulamada 1 L değil genellikle 500 mL olarak hazırlanır. Cereus selektif agar katkısı 500 mL besiyeri için 1 şişecik olarak hazırlanmıştır, ancak steril yumurta sarısı emülsiyonu 100 mL şişecik içinde olup bu miktar 1 L besiyeri için kullanılır. Bu durumda 450 mL olarak hazırlanan bazal besiyerine 100 mL steril yumurta sarısı emülsiyonundan aseptik koşullar altında 50 mL alınıp bazal besiyerine ilave edilmesi gerekir. Eğer kullanım koşuluna bağlı olarak 1 L besiyeri hazırlanması gerekli ise 43 g/ 0,9 L bazal dehidre besiyeri, otoklav sonrası

100 mL steril yumurta sarısı emülsiyonu ve 2 şişe selektif katkı şeklinde olmalıdır. Yaygın kullanımda besiyerinin hazırlanması için 450 mL saf su içinde 21,5 g dehidre besiyeri kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Su banyosunda 45-50 ºC'a soğutulup üzerine oda sıcaklığına hatta 35-37 ºC'a ısıtılmış 50 mL steril yumurta sarısı emülsiyonu ile 1 mL steril saf suda çözündürülmüş 1 şişecik *B. cereus* selektif katkısı ilave edilir ve karıştırılarak steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri yumurta sarısı nedeni ile bulanık ve hafif portakal renklidir. 25 ºC'ta pH'sı 7,2±0,2'dir. Besiyeri selektif katkısında bulunan polimiksin (Merck 1.09875) refakatçi florayı baskılarken bu konsantrasyon *B. cereus* üzerinde olumsuz etki yapmaz. Eğer analiz edilecek gıdada refakatçi flora varlığı beklenmiyor veya bu floranın az sayıda olduğu tahmin ediliyor ise polimiksin kullanılması zorunlu değildir. *B. cereus* mannitol negatif olduğu için refakatçi flora içindeki mannitol pozitif olanlardan rahatlıkla ayrılır. *B. cereus* mannitolü kullanamadığı için kırmızı koloni oluştururken mannitol pozitif olanların koloni rengi sarı-pembedir (bknz⇒ Ek B29). Besiyeri bileşimindeki yumurta sarısı ise *B. cereus* suşlarının lesitinaz aktivitesi ile belirlenmesini sağlar. *B. cereus* lesitinaz pozitif olduğu için kolonileri etrafında beyaz bir presipitasyon meydana gelir. Çoğu *B. cereus* suşunda bu reaksiyon 18 saat gibi kısa bir süre içinde belirgin olarak izlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 11,6 L bazal besiyeri hazırlanabilir.

15.17.02. Polymyxin B Sulfate (Merck 1.09875)

Bacillus cereus selective supplement adı ile de bilinir. Başta Cereus selective agar olmak üzere pek çok besiyerinde katkı olarak kullanılır. Selektif katkı şişeciğine 1 mL steril saf su ilave edilir ve iyice karıştırılır. Otoklavlanmış ve 45 ºC'a soğutulmuş 450 mL Cereus selective agar bazal besiyerine 50 mL yumurta sarısı emülsiyonu ile birlikte katılır. Yine *B. cereus* analizinde zenginleştirme amacıyla kullanılan CASO broth besiyerine ilave edilebileceği gibi başka besiyerlerinde de farklı konsantrasyonlarda kullanılabilir. 1 şişeciğin bileşiminde 50.000 IU polymyxin B sulfate vardır.

15.17.03. Egg yolk Emulsion 50% (Merck 1.03784)

Bileşimi 500 mL/L yumurta sarısı, 4,25 g NaCl ve 1 litreye tamamlayacak kadar saf su şeklindedir. MYP agar katkısıdır. PEMBA (polymyxin pyruvate egg yolk mannitol bromothymol blue) agar katkısı olarak da kullanılır. *B. cereus* analizinde lesitinaz aktivitesinin belirlenmesi içindir.

15.17.04. CASO Broth + Polymyxin B Sulfate

EMS yöntemi ile *B. cereus* sayılmasında kullanılan besiyeridir. CASO broth tek kuvvette 30 g/L, çift kuvvette 60 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak saf su içinde eritilir, tüplere 10'ar mL ya da amaca uygun şekilde erlenlere dağıtılıp otoklavda 121 ºC'ta 15 dk sterilize edilir. Bileşimi, 50.000 IU polymyxin B sulfate

olan *Bacillus cereus* selective supplement, 5 mL steril saf su ile çözülür. Bu çözelti tek kuvvette hazırlanmış CASO Broth besiyerine 0,1 mL/L ve çift kuvvette hazırlanmış olana 0,2 mL/L olacak şekilde ilave edilir.

15.18. Enterokoklar

15.18.01. Chromocult Enterococci Agar (Merck 1.00950)

Standart mikrobiyolojik analizlerde suda, gıdalarda ve diğer çevresel numunelerde enterokokların izolasyonunda, tanımlanmasında ve sayılmasında kullanılan selektif katı besiyeridir. Dehidre besiyeri 33 g/L olacak şekilde saf suya ilave edilir. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. 25 ºC'ta pH 7,0±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berraktır ve hafif sarı renktedir. 4±2 ºC'ta ve karanlıkta saklanmak koşulu ile 2 hafta depolanabilir. Analiz edilen numunede *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* ve *E. hirae* varlığı fekal bulaşmayı gösterir. Besiyeri bileşimindeki fosfatlar, Tween 80 ve seçilmiş peptonlar enterokokların gelişimini destekler. Enterokoklar, besiyerindeki kromojenik substratları parçalayarak kolonilerin kırmızı renk almasını ve enterokokların kolayca saptanmasını sağlar. Sodyum azid ve safra tuzları çoğu refakatçi mikroflorayı baskılar. Enterokok olmayan bakteriler renksiz, mavi-mor veya turkuaz renkte koloniler oluşturur. Bunlar enterokokların ürettiği kırmızı kolonilerden kolayca ayrılır (bknz⇒ Ek B30). 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 15,1 L besiyeri hazırlanabilir.

15.18.02. Slanetz and Bartley Agar incl. TTC acc. ISO 7899 (Merck 1.05262)

ISO 7899'a uygundur. Standart mikrobiyolojik analizlerde su ve diğer sıvı numunelerde membran filtrasyon yöntemiyle enterokokların sayımı için kullanılır. Dehidre besiyeri 41,5 g/L olacak şekilde saf su içinde kaynatılarak sterilize edilir. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyerinin selektif sterilizasyonu, agarın tümüyle eritildiği ısıl işlem sırasında sağlanır. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtma besiyeri selektivitesini azaltabilir. Selektif sterilizasyon sonrasında hızla soğutulup steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı-kahve olup 25 ºC'ta pH'sı 7,2±0,2'dir. Besiyeri bileşimindeki sodyum azid refakatçi Gram negatif florayı inhibe eder. Enterokoklar TTC'yi indirgeyerek kırmızı renkli formazona dönüştürürler. Dolayısıyla enterokok kolonileri bu besiyerinde kırmızı renkleri ile tanımlanır (bknz⇒ Ek B31). 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12 L besiyeri hazırlanabilir.

15.18.03. ReadyCult Enterococci (Merck 1.01299)

Su analizleri için hazırlanmış ve ışınlanarak sterilize edilmiş dehidre formdaki Chromocult Enterococci broth besiyeridir. Analiz edilecek 100 mL suya ilave edilip karıştırılır ve doğrudan inkübasyona bırakılır. ReadyCult Enterococci su analizinde enterokokların varlığını ya da yokluğunu gösteren analiz için kullanılmaktadır. Bu nedenle analizin yapılacağı kabın önceden sterilize edilmiş olması gereklidir. Aynı şekilde besiyeri su numunesine ilave edilirken gerekli hijyenik kurallara uyulmalıdır. Bu besiyeri 20 analizlik paketler halindedir. Besiyeri bileşiminde bulunan sodyum azid, özellikle Gram negatif bakterilerin gelişmesini baskılar. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (X-GLU) parçalanması, özel peptonlar ile desteklenir. X-GLU'nun parçalanması sonunda oluşan mavi yeşil renk oluşumu (bknz⇒ Ek B32) enterokoklar (D grup streptokoklar) için karakteristiktir. İnkübasyon sonunda kabın sadece üst kısmının mavi yeşil olması dahi pozitif sonuçtur.

15.19. *Pseudomonas*

15.19.01. Pseudomonas Selective CFC/CN Agar base acc. ISO 13720 ve ISO 16266 (Merck 1.07620)

CN katkısı kullanıldığında ISO 16266, CFC katkısı kullanıldığında ISO 13720'ye uygundur. In vitro yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde *Pseudomonas* aranması ve sayılması için selektif katı besiyeri olarak kullanılır. 500 mL saf su içinde 24,2 g dehidre besiyeri ve 5 mL gliserol kaynatılarak çözülür ve otoklavda 121 ºC'ta 15 dk süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası besiyeri 45-50 ºC'a soğutulur ve CN ya da CFC selektif katkıdan 1 şişecik eklenir, karıştırılır ve Petri kutularına dağıtılır. Besiyeri 45-50 ºC'ta 4 saatten fazla tutulmamalıdır. Her iki selektif katkı da 2 mL eşit hacimde alkol/su karışımı içinde çözülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve renksiz olup, otoklav sonrası 25 ºC'ta pH'sı 7,1±0,2'dir. Pepton karışımı, *Pseudomonas* türlerinin gelişimini sağlar. Potasyum sülfat ve magnezyum klorür pigment oluşumunu destekler. Bazal besiyeri uygun selektif katkıların eklenmesi ile *Pse. aeruginosa* (CN agar) ya da *Pse. cepacia* (syn. *Burkholderia cepacia*) dâhil *Pseudomonas* türleri için (CFC agar) selektif olur (bknz⇒ Ek B33). *Pseudomonas* CFC selektif agar, yüzeye yayma ile kullanılırken *Pseudomonas* CN agar membran filtrasyon için önerilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 10,3 L besiyeri hazırlanabilir.

15.19.02. Pseudomonas CN Selective Supplement (Merck 1.07624)

ISO 16266'e uygundur. Selektif katkı şişesine eşit hacimde karıştırılmış 2 mL su/alkol çözeltisi eklenir ve yavaşça karıştırılır. Gliserol ilave edilerek hazırlanmış, sterilize edilmiş ve soğutulmuş 500 mL besiyerine ilave edilir ve Petri kutularına dökülür. 1 şişeciğin bileşimi, cetrimide 100 mg ve nalidixic acid

7,5 mg şeklindedir. Liyofilize formdaki 2 farklı antibiyotik Gram pozitif ve Gram negatif refakatçi florayı baskılar.

15.19.03. Pseudomonas CFC Selective Supplement (Merck 1.07627)

ISO 13720'ye uygundur. Selektif katkı şişesine eşit hacimde karıştırılmış 2 mL su/alkol çözeltisi eklenir ve yavaşça karıştırılır. Gliserol ilave edilerek hazırlanmış, sterilize edilmiş ve soğutulmuş 500 mL besiyerine ilave edilir ve Petri kutularına dökülür. 1 şişeciğin bileşim cetrimide 5 mg, fucidin 5 mg ve cephalotin 25 mg şeklindedir. Liyofilize formdaki 3 farklı antibiyotik Gram pozitif ve Gram negatif refakatçi florayı baskılar.

15.19.04. King Agar B, Base (Dansk Standard) (Merck 1.10991)

Dehidre besiyeri 33,5 g/L olacak şekilde ve 10,0 g/L gliserol ile birlikte saf suda ısıtılarak çözündürülür. 121 °C'ta 15 dk otoklavda sterilize edilir. Besiyerinin otoklav sonrasındaki 25 °C'taki pH'sı 7,1±0,2'dir. Petri kutularındaki besiyeri berraktır ve sarımsı kahverengindedir (bknz⇒ Ek B34).

Bu besiyeri dökme kültür yöntemi ile sularda *Pse. aeruginosa* sayımında kullanılabileceği gibi membran filtrasyonla yapılan analizde tipik olmayan kolonilerin doğrulanması için de kullanılır. Pseudomonas CN besiyerinde kırmızımsı kahverengi koloniler King agara sürülür ve 36±2 °C'ta 5 güne kadar inkübasyona bırakılır. UV lamba ile floresan veren koloniler *Pse. aeruginosa* olarak doğrulanır. Pozitif sonuç genellikle 1 gün inkübasyondan sonra alınır. UV lamba ile yapılan kontrolde uzun süre UV ışığa maruz kalan koloniler hasar görebilir. 1 kutu dehidre besiyeri ile gliserol eklenmiş şekli ile 15,07 L besiyeri hazırlanabilir.

15.20. Diğer Besiyerleri

15.20.01. Shigella Broth Base

Shigella spp. aranmasında zenginleştirme amacıyla kullanılan bu besiyeri laboratuvarda hazırlanabilir, ancak ticari preparatların kullanılması önerilir. Bileşimi casein peptone 20,0 g/L, dextrose 1,0 g/L, Tween 80 1,5 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L, K_2HPO_4 2,0 g/L, NaCl, 5.0 g/L şeklindedir. Bileşenler saf suda gerekirse ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav çıkışında oda sıcaklığına geldiğinde 0,5 m/L olacak şekilde novobiocin eklenir. Besiyeri pH'sı 25 °C'ta 7,0±0,2'dir.

15.20.02. Peptone Sorbitol Bile (PSB) Broth

Yersinia spp. spp. aranmasında zenginleştirme amacıyla kullanılan bu besiyeri laboratuvarda hazırlanabilir, ancak ticari preparatların kullanılması önerilir. Bileşimi Na_2HPO_4 8,23 g/L, $NaH_2PO_4.H_2O$ 1,2 g/L, bile salts no 3 1,5 g/L, NaCl 5,0 g/L, sorbitol 10,0 g/L ve peptone 5,0 g/L şeklindedir. Bileşenler saf suda gerekirse ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Besiyeri pH'sı 25 °C'ta 7,6±0,2'dir. Ancak farklı marka ürünlerinde pH 7,1±0,2 olarak da görülmektedir.

15.20.03. BAT Medium (BAT Agar) (Merck 1.07994)

IFU (Uluslararası Meyve Suyu Federasyonu) resmi analiz yöntemine göre *Alicyclobacillus* türlerinin analizi için hazırlanmış bir besiyeridir. BAT agar ve BAT medium olarak anılır. Salça, soslar vb. gıda maddeleri analizinde de kullanılabilir. Dehidre besiyeri 29,0 g/L olacak şekilde saf su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Besiyeri pH'sı orijinal olarak agarın jel yapısını korumak için 5,3±0,2'ye ayarlanmıştır. Otoklav sonrası pH'yı 4,0±0,2'ye düşürmek için 45-50 °C'a soğutulan besiyerine kontrollü olarak 1 N H_2SO_4 eklenir, karıştırılıp Petri kutularına dökülür (bknz⇒ 04.06.03 pH ayarlama bölümü). Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı olup, buzdolabı sıcaklığında ve karanlıkta olacak şekilde 2 haftaya kadar depolanabilir. BAT Agar bütün *Alicyclobacillus* türlerinin gelişmesini destekler (bknz⇒ Ek B35). Düşük pH ve yüksek inkübasyon sıcaklığı refakatçi floranın gelişimini baskılar. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri 17,2 L BAT agar hazırlanabilir.

15.20.04. GSP Agar Base (Merck 1.10230)

Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base acc. to KIELWEIN adı ile de bilir. Besiyeri bileşimindeki yegâne besin maddeleri nişasta ile glutamat olup refakatçi mikrofloranın büyük bir kısmı bu besin maddelerini metabolize edemez. Nişasta, *Aeromonas* tarafından kullanılır ve oluşan asitlik, pH indikatörü olan phenol red ile koloninin sarı renk almasını sağlar. Bu besiyerinde gelişebilen *Pseudomonas* spp. ise nişastayı kullanamaz ve mavi menekşe renkli koloniler oluşturur. Bazal besiyeri 45 g/L olacak şekilde saf suda ısıtılarak eritilip otoklavda 121 °C'ta 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 45-50 °C'a soğuyunca 100.000 IU/L sodium penicilin isteğe bağlı olarak 0,01 g/L pimaricin eklenir, karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renkte olup pH'sı 25 °C'ta 7,2±0,2'dir. Ekimden sonra 28-30 °C'ta 3 güne kadar inkübe edilir. 500 g olan 1 kutu GSP agar ile 11,1 L besiyeri hazırlanır.

16. HİJYEN ANALİZLERİ

Özlem E. SAĞDAŞ, Gülten KOLCUOĞLU, Bilge HALKMAN

16.01. Havada Mikrobiyolojik Analiz 589
16.01.01. MAS-100 Eco Hava Örnekleme Cihazı 589
16.01.02. RCS Hava Örnekleme Cihazı 590
16.02. Yüzey ve Sıvılarda Mikrobiyolojik Analiz 590
16.02.01. Svap ve Örnekleyici; Yüzey ve Sıvı Testleri için 590
16.02.02. Envirocheck® Contact plates; Yüzey Testi için 591
16.02.03. Envirocheck® Contact slides; Yüzey ve Sıvı Testleri için 592
16.02.04. ReadyCult® Coliforms-Enterococci 592
16.02.04.01. ReadyCult® Coliforms 592
16.02.04.02. ReadyCult® Enterococci 593
16.02.05. Hijyen Monitörleri 593
16.02.05.01. HY-RiSE; Renkli Hijyen Test Şeridi 593
16.02.05.02. HY-LiTE; Hijyen Monitör Sistemi 593

16.01. Havada Mikrobiyolojik Analiz

Hava kaynaklı mikroorganizmaların endüstriyel üretim hattını ve ürünleri etkileyebildikleri veya kontaminasyona neden olabildikleri tüm alanlarda etkili hava örneklemesi yapmak giderek artan bir ihtiyaç haline gelmiştir. ISO, GMP, HACCP, FDA, USP ve bunun gibi uluslararası kabul görmüş kalite standartlarında havadaki mikroorganizma sayısının belirlenmesi için, açık bırakılmış Petri kutusu yerine, belirli bir hacim havadaki sayının belirlenmesi istenmektedir. 07.02.06. Hava ve Yüzeylerin Analizi Bölümünde konu ile ilgili teknik ayrıntı verilmiştir.

16.01.01. MAS-100 Eco® Hava Örnekleme Cihazı (Merck 1.09227)

Havadaki mikroorganizmaların agar yüzeyine çarpma hızı yaklaşık olarak 11 m/sn'dir. Bu sayede, 1 µm çapındaki hücreler dahi Petri kutusundaki besiyerine aktarılmış olur. Aspirasyon hacmi, ISO 14698'e uygun olarak 100 L/dk'dır.

Kalite standartları gerekliliklerini yerine getiren ve "Andersen'in çarpma prensibi"ne dayalı olarak çalışan MAS-100® Eco hava örnekleme cihazıyla birlikte Envirocheck® Settle hazır besiyerleri kolaylıkla kullanılabilir.

Envirocheck® Settle hazır besiyerleri

Katalog no	Ürün adı ve bileşimi	Açıklama
1.46002.0020	Tryptic soy agar; nötralizanlı (lesitin, polisorbat 80, histidin, tiyosülfat)	Dezenfeksiyon kontrolü
1.46052.0020	Sabouraud %4 dextrose agar; nötralizanlı (lesitin, polisorbat 80, histidin, tiyosülfat)	Maya ve küf kontrolü

16.01.02. RCS® Hava Örnekleme Cihazı (Merck 1.44194)

RCS® hava örnekleme cihazı, Reuter'a göre merkezkaç çarpma ilkesini kullanır ve mikroorganizmaların agar stripler üzerinde tutunmasını ve cihazda bulunan rotor sayesinde havanın agar yüzeyine eşit miktarda dağıtılmasını sağlar. Aspirasyon hacmi, ISO 14698'e uygun olarak 100 L/dk'dır. İlave edilen gaz adaptör seti ve oriface seti ile basınçlı hava analizine de imkân tanır. ISO 14698-1'e göre kapsamlı sistem sağlayan, minimum servis ve bakım gerektiren ve yüksek teknolojik donanımlara sahip gelişmiş bir cihazdır.

Katalog No	Ürün Adı	Hedef Mikroorganizma
1.44253.0050	Tryptic soy agar, TC	Toplam bakteri
1.44243.0050	Sabouraud Dextrose Agar, SDX	Maya ve küf
1.44242.0050	Rose Bengal Agar with streptomisin, YM	Maya ve küf
1.44099.0025	MacConkey Agar, C	Koliform bakteri

16.02. Yüzey ve Sıvılarda Mikrobiyolojik Analiz

16.02.01. Yüzey ve Sıvı Testleri için; Svap ve Örnekleyici

Toplam canlı ve koliform bakteri ile maya ve küflerin tespitinde hammadde, ekipman, yüzey ya da sıvılardan örnek alımını kolaylaştırarak hijyen denetimini sağlayan örnekleyici ve svaptan oluşur. Örnekleyicide kullanılan membran filtre 0,45 µm gözenek çapındadır. Sonuçlar karşılaştırma tablosuna göre değerlendirilir.

Uygulama:

1) Sıvı veya yüzeyden örnek alımı: Örnekleyici kap üst seviyesine kadar test edilecek sıvı ile doldurulur ve örnekleyici sıvının içerisinde 30 sn yatay şekilde tutulur.

2) İnkübasyon: Membran kısmı aşağı gelecek şekilde inkübasyona bırakılır.

3) Sayım: Karşılaştırma tablosu kullanılarak sayım yapılır.

Svap	Örnekleyici	Test Kiti (Svap + Örnekleyici Set)	Besiyeri	Hedef Mikroorganizma
Fosfat Tamponlu Svap (A982330)	HPC Total Count (A982325)	HPC Total Count Test Kiti (A982335)	m-HPC agar	Toplam canlı-Stresli ortam
	Coli-Count™ (A982315)	Coli-Count™ Test Kiti (A982320)	Koliform agar	Koliform
	Yeast and Mold (A982350)	Yeast and Mold Test Kiti (A982355)	m-Green agar	Maya ve küf

16.02.02. Yüzey Testi için; Envirocheck® Contact plates

Gıda endüstrisinde işleme tezgâhlarının mikrobiyolojik yükü çoğu defa önemlidir. Mikrobiyel açıdan temiz olması gereken tüm yüzeylerde mikrobiyel kontaminasyonun belirlenmesinde kullanılan basit ve etkili bir araçtır. HACCP ve/veya ISO 22000 programı çerçevesinde kritik kontrol noktalarında mikrobiyel hijyen kontrolü amacıyla yaygın olarak kullanılır.

Plastik Petri kutusuna taşmayacak ancak hafif bir bombe yapacak kadar besiyeri dökülmüştür. Örnek alındıktan sonra 28-30°C'ta 48 saat inkübasyondan sonra koloniler sayılır. Standart 55 mm dış çapın, 25 cm^2 besiyeri yüzey alanı sağlaması nedeni ile nitel (var/yok testleri) ve nicel sonuçlar için çeşitli uluslararası standartlara uygundur. Üretim alanları, çevre yönetimi ve klinik uygulamalarda çalışma tezgâhından, iş giysisine kadar uzanan yaygın bir kullanım alanı vardır.

Petri kutularının ışınlanarak sterilize edilmiş ve üç kat ambalajlanmış olması steril alanlarda kullanıma imkân tanıdığı gibi, blister paketleme şekli (alüminyum folyo), her bir Petri kutusunun diğerlerinin sterilitesini etkilemeden kullanılmasını da sağlar.

Katalog no	Ürün adı	Açıklama
1.46549.0020	SABOURAUD %4 dextrose agar; kloramfenikollü	Maya ve küf kontrolü
1.46253.0020	VRBD agar	*Enterobacteriaceae* kontrolü

16.02.03. Envirocheck® Contact slides; Yüzey ve Sıvı Testleri için

HACCP ve/veya ISO 22000 programı çerçevesinde kritik kontrol noktalarında mikrobiyel hijyen kontrolü amacıyla yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda bu slaytlar sıvıların mikroorganizma içeriğini belirlemede de kullanılabilir.

Yüzey ve su numunelerinde 5 farklı parametre (dezenfeksiyon kontrolü, toplam bakteri sayımı, maya ve küf kontrolü, *Enterobacteriaceae* kontrolü, toplam koliform/ *E. coli* kontrolü) için yarı nicel sonuçlar veren iki yüzünde farklı besiyeri bulunduran plastik ve eğilebilir özellikte slaytlardır. Kullanımı kolaydır. Esnekliği sayesinde ulaşılması zor yerlerde bile örnek alımını sağlar. İnkübasyondan sonra, sonuçlar karşılaştırma tablosuna göre değerlendirilir.

Katalog No	Ürün Adı	Açıklama
Contact DC (Merck 1.02147)	A yüzü: Tryptic soy agar B yüzü: Tryptic soy agar nötralizanlı	Dezenfeksiyon kontrolü
Contact TVC (Merck 1.02149)	A yüzü: Nutrient agar with TTC B yüzü: Nutrient agar	Toplam bakteri sayımı
Contact YM(R) (Merck 1.02139)	A yüzü: Tryptic soy agar with TTC B yüzü: Rose bengal chloramphenicol agar	Maya ve küf kontrolü
Contact E (Merck 1.02137)	A yüzü: Plate count agar B yüzü: VRBD agar	*Enterobacteriaceae* kontrolü
Contact C (Merck 1.02136)	A yüzü: Plate count agar B yüzü: Chromocult® Coliform agar	Toplam koliform/ *E. coli* kontrolü

16.02.04. ReadyCult® Coliforms-Enterococci

Su örneklerinde fekal kontaminasyon ve hijyen indekslerinde bakterilerin hızlı tespiti ve tanımlanmasında kullanılır. Tek kullanımlık, hazırlama gerektirmeyen ve çalışma sahasında kullanılabilen steril besiyerleridir.

16.02.04.01. ReadyCult® Coliforms (Merck 1.01295/ 1.01298)

Besiyeri bileşimindeki lauryl sülfat refakatçi florayı baskılarken kromojenik substrat X-GAL koliform bakterilerin ve florojenik substrat MUG ise *E. coli* belirlenmesinde kullanılır.

EPA yönergelerine uygundur. 50 mL ve 100 mL için olmak üzere su numunesi analizinde paralel olarak koliform grup bakteriler ve *E. coli* var/yok testi için kullanılır. Besiyeri ilave edilmiş numune 35-37 °C'ta 18-24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyeri renginin mavi-yeşil olması koliform bakterilerin varlığına işaret eder. Koliform pozitif örneklere UV lambası ile floresan testi uygulandığında floresan ışımanın olması *E. coli* varlığını gösterir.

ReadyCult® Coliforms konusunda 14.06.04. Koliformlar; Var/yok Analizi Bölümünde de bilgi verilmiştir.

16.02.04.02. ReadyCult® Enterococci (Merck 1.01299)

Besiyeri bileşimindeki sodyum azid, refakatçi florayı ve özellikle refakatçi floradaki Gram negatif bakterileri baskılar. Seçilmiş peptonların desteğiyle X-GLU (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside), enterokoklar için karakteristik olan β-D-glucosidase enzimi ile yoğun mavi-yeşil renk veren bileşiğe parçalanır. Sodyum azid konsantrasyonu, aynı enzime sahip refakatçi floranın inhibisyonu açısından önemlidir.

100 mL su numunesinde enterokokların var/yok testi için kullanılır. Besiyerinin bileşimindeki kromojenik substrat enterokokların tespiti içindir. Besiyeri ilave edilmiş örnek 35-37 °C'ta 18-24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda besiyeri renginin mavi-yeşil olması enterokokların varlığını gösterir.

ReadyCult® Enterococci hakkında 14.21.03. Enterokoklar; 100 mL Suda Var/ yok Analizi Bölümünde de teknik bilgi verilmiştir.

16.02.05. Hijyen Monitörleri

16.02.05.01. HY-RiSE®; Renkli Hijyen Test Şeridi (Merck 1.31200)

HY-RiSE®, özellikle ürün kalıntısı şeklindeki biyolojik kirliliğin belirlenmesi ile yüzey temizliğini kontrol etmek için geliştirilmiştir. Görsel kontrollerde fark edilemeyebilen gıda kalıntılarının 4-5 dk gibi çok kısa bir süre içinde belirlenebilmesi, üretime başlanmadan önce tekrar temizlik yapılmasına olanak sağlar. HY-RiSE® seti, kimyasalları ve 50 test şeridi ile önlük cebine sığabilecek kadar küçük kutusunda bulunduğu için kolayca taşınıp istenilen yerde analiz yapılabilir. HY-RiSE® sistemi, sonuçların değerlendirilmesi için ilave bir analitik cihaz gerektirmemekte ve pratik kullanıma olanak sağlamaktadır. 07.02.06. Hava ve Yüzeylerin Analizi Bölümünde konu ile ilgili teknik ayrıntı ve görseller (bknz⇒ şekil 07.03) vardır.

16.02.05.02. HY-LiTE®; Hijyen Monitör Sistemi

Pek çok endüstri dalında hijyen kuralları ve personel etkinliğinin kontrolü ile HACCP sisteminin uygulanması için gerek duyulan her yerde, hızlı, doğru ve güvenilir sonuçlar veren hijyen izleme sistemidir. Bu sistemin kullanılması için ayrı bir laboratuvara gerek yoktur. 60 sn gibi kısa bir sürede elde edilen sonuçlar, olası tehlikeler konusunda kullanıcıları uyararak gerekli önlemlerin zamanında alınmasını sağlar. Sistemin prensibi, canlı ve cansız tüm hücrelerde bulunan ATP'nin (adenozintrifosfat) belirlenmesine dayanır. Hijyen kontrolünde, indikatör bakteri gibi mikroorganizmaların tespitine dayanan standart mikrobiyolojik yöntemlerin aksine bu sistem, temizlenmiş yüzeylerde herhangi bir biyolojik materyal kalıntısı varlığını tespit ederek toplam biyolojik kirliliği saptar. Böylece olası mikrobiyolojik tehlike oluşturan tüm kirliliklerin belirlenmesine olanak

sağlar. Analiz edilecek yüzey veya sudan alınan numune, özel olarak tasarlanmış HY-LiTE® kalemlerinde bulunan reaktif (enzim) ile karıştırılır. Ortamda bulunan ATP, bu reaktif ile reaksiyona girerek ışıma oluşturur. Meydana gelen bu ışıma, HY-LiTE® cihazı ile ölçülür. Böylece analiz edilen suda veya yüzeyde olası mikrobiyolojik tehlike miktarı belirlenir.

Katalog No	Ürün Adı
1.30100.0301	HY-LiTE® Hijyen monitörü
1.30101.0021	HY-LiTE® Örnekleme kalemi ve svabı (yüzey testleri için)
1.30102.0021	HY-LiTE® Örnekleme kalemi (CIP/Sıvı testleri için)

07.02.06. Hava ve Yüzeylerin Analizi Bölümünde konu ile ilgili teknik ayrıntı ve görseller (bknz⇒ şekil 07.04) vardır.

17. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA GÜVENLİK

Nevin KOÇAKER

17.01. İş Sağlığı ve Güvenliği Kavramı 595
17.02. İş Kazası ve Meslek Hastalığı 596
17.03. Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Karşılaşılan Tehlikeler ve Riskler 597
17.03.01. Fiziksel Tehlikeler 598
17.03.01.01. Isı Kaynaklı Tehlikeler 598
17.03.01.02. Elektrik Kaynaklı Tehlikeler 598
17.03.01.03. Sıkıştırılmış Gaz Kaynaklı Tehlikeler 599
17.03.01.04. Yangın 600
17.03.01.05. Kayma-düşme 600
17.03.01.06. Gürültü Kaynaklı Tehlikeler 600
17.03.01.07. Radyasyon Kaynaklı Tehlikeler 601
17.03.02. Biyolojik Tehlikeler 601
17.03.02.01. Solunum Yolu (Aerosoller) ile Bulaşı 602
17.03.02.02. Deri-Mukoza Yoluyla Bulaşı 602
17.03.02.03. Ağız Yoluyla Bulaşı 602
17.03.03. Kimyasal Tehlikeler 603
17.03.03.01. Solunum Yolu (Aerosoller) ile Maruziyet 604
17.03.03.02. Temas Yolu ile Maruziyet 604
17.03.03.03. Ağız Yolu ile Maruziyet 605
17.03.04. Ergonomik Tehlikeler 605
17.03.05. Acil Durumlar 606
17.03.05.01. Laboratuvar Kazaları, Dökülme ve Saçılmalar 607
17.03.05.01.01. Biyolojik Dökülme ve Saçılmalar 607
17.03.05.01.02. Kimyasal Dökülme ve Saçılmalar 608
17.04. Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Karşılaşılan Tehlikeleri Önleme 608
17.04.01. Laboratuvarlar için Genel Güvenlik Prensipleri 609
17.04.02. Tehlike/ Risk Kontrolü 612
17.04.02.01. Tehlikeliyi Tehlikesizle Değiştirme 612
17.04.02.02. Mühendislik Önlemleri 613
17.04.02.03. Yönetsel Önlemler 613
17.04.02.04. Kişisel Koruyucu Donanımlar 613

17.01. İş Sağlığı ve Güvenliği Kavramı

Çalışanların işyeri ortamı ve çalışma koşullarından kaynaklı sağlıklarını kaybetmelerini önlemek için tedbirlerin alınması "iş sağlığı kavramını" ifade etmektedir. Çalışanların kazaya uğramalarını önleyici tedbirleri ifade eden "iş güvenliği" ise işyerinde kullanılan araç, gereç ve maddelerin kullanımı ve

varlığından doğabilecek risklere karşı çalışanların korunması ve gerekli tedbirlerin alınmasını ifade eder.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), "sağlığı" yalnız hastalık ve sakatlığın olmaması durumu olarak değil, bedensel, ruhsal ve sosyal yönden tam bir iyilik hali olarak tanımlamaktadır. Bu açıdan "iş sağlığı" kavramının geniş bir çerçevede anlaşılması gerekmektedir.

ILO/WHO İş Sağlığı Ortak Komitesi'nin iş sağlığı alanındaki hedefi şu şekilde açıklanmıştır: "İş Sağlığı hangi işi yapılırsa yapılsın bütün çalışanların fiziksel, zihinsel ve sosyal refahlarının mümkün olan en yüksek düzeye çıkarılmasını ve burada tutulmasını, çalışma koşullarından kaynaklanan sağlık sorunlarının önlenmesini, çalışanların işleriyle ilgili sağlığa zararlı risklerinden korunmalarını, çalışanların fiziksel ve biyolojik kapasitelerine uygun mesleki ortamlarda çalıştırılmalarını, özetle işin insana, insanın da işine uygun hale getirilmesini hedefler.".

İş sağlığı ve güvenliği kavramı, dinamik bir kavramdır. Çalışma şartları ve bireylerin sağlık ve güvenliğini kapsayan tüm durum ve risklere bağlı olarak sürekli değişim göstermektedir.

Bu bahsedilenler çerçevesinde; çalışanın, iş yerlerinde işin yürütülmesi sırasında oluşan veya oluşabilecek tehlikelerden ve sağlığına zarar verebilecek unsurlardan korunmasını, aynı zamanda işyeri ortamının iyileştirilmesini hedef alan sistemli ve bilimsel çalışmaların tümüne "İş Sağlığı ve Güvenliği" denilir.

17.02. İş Kazası ve Meslek Hastalığı

Kaza kavramı genel olarak; kasıt olmadan aniden meydana gelen ve arzu edilmeyen şekilde sonuçlanan olay olarak ifade edilir. Standartlarda ise kaza; ölüme, hastalığa, yaralanmaya, hasara veya diğer kayıplara sebebiyet veren istenmeyen olay olarak tanımlanmıştır.

Meslek hastalıkları ise, iş sağlığı ve güvenliğindeki diğer bir risk gurubudur. Meslek hastalıkları, aniden ortaya çıkmayan belirli bir süre sonra kendisini gösteren hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Mesleki bir faaliyetin yürütülmesi esnasında veya birtakım işlerde sürekli çalışma sonucunda çalışanda bu faaliyetlerle doğrudan bağlantılı hastalıklar oluşabilmektedir.

Bir iş kazasının ve meslek hastalığının meydana gelmesinde; sosyolojik, psikolojik, fizyolojik, eğitim ve teknik konular etkili olmaktadır. İş kazalarının iki temel sebebi vardır. Bunlar, güvensiz çalışma davranışları ve güvensiz çalışma şartlarıdır. Güvensiz çalışma şartları da fiziksel ve çevresel şartlar olarak iki kısma ayrılır. Fiziksel şartlar; bozuk ekipmanı, yetersiz makine muhafazasını ve koruyucu donanım eksikliğini kapsar. Çevresel şartlar ise; gürültü, radyasyon, toz ve stres gibi etkenleri kapsar.

İş kazalarının ve meslek hastalıklarının çoğalmasında rol oynayan temel etkenler şunlardır:

-Kazaların ve hastalıkların oluşumunda denetim ve kontrol yetersizliği,
-Teknolojik gelişimden faydalanmama,
-Eğitimsizlik (işbaşı, iş sağlığı ve güvenliği, vb. eğitimler),
-Koruyucu önlem yetersizliği, verilen koruyucuların titizlikle takip edilmeyişi, uygulamadaki ihmal ve önemsememe,
-Sağlığa ve emniyete elverişli olmayan koşullar,
-Deneyimsiz ve eğitimsiz eleman istihdamı

Kazaların oluşumu incelendiğinde, kaza zinciri faktörleri dik duran domino taşlarına benzetilerek örneklenmişlerdir. Kazalar beş temel faktörün oluşturduğu bir zincir olarak kabul edilir. Dik duran domino taşları modeline göre kaza zinciri faktörü şu şekilde sıralanmıştır:

-Doğa koşulları (doğal yapı)
-Kişisel eksiklikler
-Güvensiz durum ve davranışlar
-Kaza
-Zarar (ölüm, yaralanma).

Zinciri oluşturan faktörlerden biri olan “güvensiz durum ve davranışlar” üstünde durulması gereken en önemli faktör olarak önem kazanmıştır. Bu modele göre “güvensiz durum ve davranışların” ortadan kaldırılması, birinci ve ikinci faktörlerin kazaya sebebiyet verme ihtimalini yok etmektedir. ‘‘Güvensiz durum’’ kavramı genel olarak kazalara yol açan fiziksel eksiklikleri, hatalı ve tehlikeli durumları oluşturmaktadır. ‘‘Güvensiz davranış’’ kavramı ise, çalışma sırasında kazaya sebebiyet verebilecek dikkatsiz ve tedbirsiz davranışları, hatalı ve bilgisizce yapılan hareketleri içermektedir.

Çalışan insanın güvensiz davranışlarının temelinde eğitimsizlik bulunmaktadır. Bunun yanı sıra insanın fizyolojik ve psikolojik yapısı ile çevre koşulları da güvensiz davranışları tetikleyebilmektedir. Çalışanlara İSG eğitimleri ve mesleki eğitimler verilerek ve güvenlik kültürü aşılanarak güvensiz davranışlar önemli ölçüde engellenebilir.

17.03. Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Karşılaşılan Tehlikeler ve Riskler

Tehlike, işyerinde var olan ya da dışarıdan gelebilecek, çalışanı veya işyerini etkileyebilecek zarar veya hasar verme potansiyeli olarak tanımlanabilir. Risk ise, tehlikeden kaynaklanacak kayıp, yaralanma ya da başka zararlı sonuç meydana gelme ihtimali olarak tanımlanabilir.

Bu açıdan iş kazası ve meslek hastalıklarını önlemek için ilk yapılması gereken tehlikeli durumların ortadan kaldırılmasıdır. Bunun için de önce neyin tehlikeli

olduğunun bilinmesi gerekir. Risk değerlendirmeleri bunun için yapılır. Risk oluşturan unsurlar tespit edilerek riskleri ortadan kaldıracak çözümler geliştirilir. Bu çözümlere uygun güvenlik önlemlerinin yerinde ve yeterli koruma sağlayıp sağlamadığı test edilir ve sürekli kontroller yapılır. Eğitim, ikaz ve uyarı sistemleri ile de alınan önlemler pekiştirilir.

Laboratuvar güvenliğinin temelini de risk değerlendirme oluşturur. Yapılan işin doğası gereği laboratuvarlarda fiziksel, biyolojik ve kimyasal tehlikeler söz konusudur. Bu tehlikelerin risk oluşturup oluşturmadığı ise tehlikeye maruz kalma olasılığı ve maruz kalındığı takdirde bunun sonuçlarının ne olacağı ile ilişkilidir.

Tehlikeye maruz kalma olasılığı başlıca 3 unsur ile ilişkilidir. Bunlar:

-Yapılan işlemlerin riski,
-İşlemi yapan kişinin bilgisi, deneyimi ve güvenli çalışması,
-Maruz kalma olasılığını azaltmaya yönelik alınan önlemler.

17.03.01. Fiziksel Tehlikeler

17.03.01.01. Isı Kaynaklı Tehlikeler

Yüksek veya düşük sıcaklık kaynakları temas eden deri bölgesinde yanıklara neden olabilir.

Yanık tipleri:

-Haşlanma (örn. otoklav buharına maruz kalma, sıcak sıvı dökülmesi),
-Temas yanıkları (örn. ısıtıcı tabla, etüv gibi yüksek ısı kaynaklarına temas),
-Soğuk yanıkları ve donma (örn. kuru buz, derin dondurucu kullanımı, kriyojenik uygulamalar),
-Açık alev yanıkları (örn. yangın, Bunsen beki kullanımı).

Önlemler:

-Yüksek ve düşük ısı kaynaklarının görünür yüzeylerinde ilgili uyarı işaretleri bulunmalıdır.
-Isı kaynaklı tehlikelere karşı uygun kişisel koruyucu donanım kullanılmalıdır.
-Güvenli otoklav kullanım kuralları öğrenilmeli ve bu kurallara uyulmalıdır.
-Aşındırıcı, oksitleyici, çözücü ve uçucu kimyasallar ile radyoaktif maddelerin kesinlikle otoklavlanmadığı unutulmamalıdır.

17.03.01.02. Elektrik Kaynaklı Tehlikeler

Elektrikli aletler hem yangın hem de elektrik çarpmasına yol açabilir. Tehlikelerin en başında elektrik şoku yani elektrik çarpmaları gelir. Özellikle laboratuvarlarda sıvılarla çalışılması (personel ellerinin, zemin ve yüzeylerin ıslak olması) bu riski daha da yüksektir. Elektrik arkı ve kıvılcım, ortamda yanıcı-parlayıcı maddeler ve özellikle bunların buharları varsa yangın ve patlamalara neden olabilir.

Elektrik kaynaklı tehlike nedenleri:

-Kapasite üzerinde yüklenme,

-Alet ve cihazların yanlış kullanımı,

-Yetersiz/ uygunsuz bakım,

-Güvensiz tesisat (ezik, kopuk kablolar, gevşek prizler, topraklama ve kaçak akım rölesi olmaması; sigortanın uygun olmaması, vb.)

Önlem:

-Islak elle elektrikli cihazlara temas edilmemelidir. Zemin ıslak ise hemen kurulanmalıdır.

-Güvenli tesisat için gereken önlemler alınmalıdır (CE belgeli ekipman kullanımı, topraklama sistemi, sigorta, yalıtım ve doğru kablolama, vb.).

-Yüksek enerji alanları uyarı işaretleri ile işaretlenmeli ve erişim kısıtlanmalıdır.

-Elektrik hatlarına kapasitenin üzerinde yük bindirilmemelidir.

-Çoklu prizlerin kullanımı konusu dikkatle değerlendirilmeli ve onay alınmalıdır.

-Acil durumlarda akımı kesmek için ana şaltere kolaylıkla erişilebilmelidir.

-Elektrik yangınlarında kullanılabilecek yangın söndürücü tipleri belirlenmeli (kuru toz veya CO_2 söndürücü) ve laboratuvarda bu tip yangın söndürücüler hazır bulundurulmalıdır.

-Küçük yangın kaynaklarını veya kişilerin alev alması durumunda kullanılabilecek yangın battaniyeleri hazırda bulundurulmalı ve görünür yerde tutulmalıdır.

-Elektrikle ilgili bakım ve onarım işleri bu konuda eğitim almış, ehli kişilere bırakılmalıdır. Çok acil durumlarda müdahale gerekirse cihazın fişi çekilmeli ve ancak ondan sonra müdahale edilmelidir.

-Tesisatla ilişkili işlemler sırasında uygun kişisel koruyucu donanım kullanılmalıdır.

17.03.01.03. Sıkıştırılmış Gaz Kaynaklı Tehlikeler

Sıkıştırılmış gazlar, tüp içindeki yüksek basınç nedeniyle patlayarak ortama hasar ve çalışanlara zarar verebilir. Ayrıca, gazın özelliklerine bağlı olarak yangın, patlama, solunum yoluyla zehirlenme, boğulma gibi bazı tehlikelere yol açabilirler. Bununla birlikte sıkıştırılmış gaz içeren tüplerin düşmesi ve devrilmesi ezilme yaralanmalarına da yol açabilir.

Önlem:

-Basınçlı gaz tüpleri güvenli konuşlandırılmalıdır (geçimsiz gazların bir arada bulunmamasına dikkat edilmeli, bulunan ortam iyi havalandırılmalı, yangın tehlikelerinden uzakta, devrilmeye karşı sabitlenmiş olmalı).

-Tüpler basınç regülatörü ya da koruyucu başlığa sahip olmalıdır.

-Güvenli saklama ve taşıma koşullarına dikkat edilmelidir.

-Sıkıştırılmış gazlara bağlı tehlikelere yönelik uyarı işaretleri asılmalıdır.

-Dolu ve boş tüpler ayrı yerlerde, boş tüpler kapakları takılı halde saklanmalıdır.

-Kullanım ve taşıma sırasında uygun kişisel koruyucu donanım kullanılmalıdır.

17.03.01.04. Yangın

Laboratuvar çalışmaları sırasında yangına yol açabilecek tehlikeler temel olarak aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir:

-Açık alev: Laboratuvarlarda bek alevi ve bunun gibi açık alev kaynakları en önemli yangın tehlikeleri arasında yer almaktadır.

-Elektrik: Devrelerin aşırı yüklenmesi, uzun elektrik kordonları, gereksiz yere açık bırakılan ekipmanlar ve laboratuvar için tasarlanmamış cihazlar, elektrik sistemindeki yetersiz bakım elektrik kaynaklı yangınlara neden olabilir.

-Gaz: Laboratuvarlarda kullanılan yanıcı ve patlayıcı gazlar yangına neden olabilir.

-Kimyasallar: Laboratuvarlardaki yangınların çoğu yanıcı çözücülere (solventlere) bağlıdır (ör: Etil alkol, eter gibi maddelerin parlama noktası düşük olduğundan kolaylıkla tutuşabilir).

17.03.01.05. Kayma-düşme

Kayma ve düşmeye neden olan tehlikeler, laboratuvar çalışanlarında ciddi yaralanmalara yol açabilir. Bu tür tehlike kaynakları; ıslak zeminler, düzgün olmayan zeminler, uygun monte edilmemiş dolap, raf ve cihazlar ya da ayak altındaki kablolar, borular, açık çekmeceler, vb. dir.

Önlem;

-Yere dökülenler hemen temizlenmelidir.

-Herhangi bir sebeple oluşan ıslak ve kaygan zeminler için uygun uyarı işareti konulmalı ve çevredekiler uyarılmalıdır.

-Kabloları uygun kablo kanalları kullanılarak yere sabitlenmeli ve duvar diplerinden geçirilmelidir.

-Tüm geçit yolları, giriş ve çıkışlar açık tutulmalı, yürüyüş yoluna hiçbir şekilde kutu ve benzeri malzemeler konulmamalıdır.

-Yeterli aydınlatma sağlanmalıdır.

-Yüksekte bulunan malzemelerin alınabilmesi için uygun yükseltici ekipman (taşınabilen ve sabitlenen) kullanılmalıdır.

-Dolap kapıları ve çekmeceler açık bırakılmamalıdır.

-Cihaz ve mobilyalar uygun şekilde sabitlenmelidir.

17.03.01.06. Gürültü Kaynaklı Tehlikeler

Laboratuvarda kullanılan birçok cihaz oldukça gürültülüdür. Biyogüvenlik kabini, sonikatör, derin dondurucu ve santrifüjler gürültü kaynakları arasında sayılabilir. Laboratuvarda gürültü çıkaran cihazların küçük, kapalı odalarda, sesin yankılanmasına bağlı olarak, etkisinin artabileceği de göz önüne alınmalıdır. Sesin yoğunluğuna, temas süresine ve temas sıklığına bağlı olarak işitme kaybı, psikolojik bozukluklar ve başka sağlık sorunları ortaya çıkabilir. Yüksek

düzeydeki gürültü nedeniyle kas gerilmeleri, stres, kan basıncında artış, solunum hızlanması görülebilirse de uzun dönemli esas etkisi geçici ve kalıcı işitme kaybına yol açmasıdır. Özellikle 80 dB'in üzerindeki gürültüye maruz kalma kalıcı işitme bozukluklarına neden olabilir. İş verimini azaltır.

Önlem;

-Gürültü kaynağı eğer mümkünse çalışma ortamından uzaklaştırılmalıdır.

-Uzaklaştırma mümkün değilse çalışan ve gürültü kaynağı arasına engel konulmalıdır.

-Tavan ve duvarlar sesi absorbe edecek şekilde yapılandırılmalıdır.

-Gürültü kaynaklı tehlikelere karşı uygun kişisel koruyucu donanım kullanılmalıdır (kulaklık, kulak tıkacı).

17.03.01.07. Radyasyon Kaynaklı Tehlikeler

İnsan sağlığı açısından iyonize radyasyon zararlıdır. Bu alanda gama, X ve UV ışınları yer alır. İyonize radyasyon kimyasal bağları koparır ve DNA hasarına yol açar. Bu hasar başlıca deride ve gözde ortaya çıkar. Laboratuvarda maruz kalınabilecek iyonize radyasyon türlerinden biri ultraviyole (UV) ışınlarıdır. UV lambalar ve UV ışık kaynağı kullanılan cihazlar başlıca tehlike kaynaklarıdır. UV ışınları (UVA ve UVB) kornea hasarına neden olabilir, UVB ise lense kadar ulaşıp katarakt oluşumuna neden olabilir.

Önlem;

Gama ışınlarından korunmak için:

-Kalkan ve uygun saklama kapları kullanılmalıdır.

-Kurşun önlük, eldiven, koruyucu gözlük vb. uygun kişisel koruyucu donanım kullanılmalıdır.

UV ışınlardan korunmak için:

-Floresan mikroskoplardaki UV kalkanı kullanılmalıdır.

-Yüz siperi (gözlük üzerine takılmalı), UV absorbe eden yanları kapalı gözlük (CE EN 170), önlük, eldiven gibi uygun kişisel koruyucu donanım kullanılmalıdır.

17.03.02. Biyolojik Tehlikeler

İnsan sağlığını tehdit eden biyolojik etkenler parazitler, mantarlar, bakteriler, virüsler, prionlar ve mikroorganizmaların toksinleri olarak sınıflandırılabilir. Deney hayvanlarından kaynaklanan tehlikeler de laboratuvar kaynaklı biyolojik tehlikeler arasında yer alır. Laboratuvardan kaynaklanan biyolojik tehlikelere farklı yollarla maruz kalınabilir:

-Solunum yoluyla (aerosoller)

-Deri-mukoza yoluyla (kesici-delici yaralanma, deri veya göz, ağız, burun mukozası teması)

-Ağız yoluyla (yutma)

17.03.02.01. Solunum Yolu (Aerosoller) ile Bulaşı

Havada asılı kalan sıvı veya katı parçacıklar aerosol olarak adlandırılır. Enfektif aerosoller, üzerlerinde mikroorganizma/virüs barındıran ve duyarlı bireyleri enfekte edebilen partiküllerdir. Beş mikrometreden küçük parçacıklar solunum yolunun doğal savunma engellerini aşarak doğrudan alveollere ulaşabilirler. Dolayısıyla hem ortamda uzun süre kalmaları hem de alveollere doğrudan ulaşabilmeleri nedeniyle enfektif aerosoller ciddi enfeksiyon riski oluştururlar.
Aerosol oluşturma riski yüksek olan işlemler;

Örnek hazırlama ve analiz işlemleri:
-Çalkalama (vorteksleme)
-Bakteri süspansiyonu hazırlama
-Kültür şişelerinden pasaj ve yayma hazırlama
-Sıvı numune aktarma
-Katı örnek parçalama (homojenizasyon)
-Katalaz testi
-Aglütinasyon testleri
-Alevde preparat tespiti

Pipet kullanımı;
-Besiyerine pasaj ve ekim

Dökülme ve saçılmalar (laboratuvar kazaları).

17.03.02.02. Deri-Mukoza Yoluyla Bulaşı

-Kesici-delici yaralanmalar deri yoluyla olan bulaşılar içerisinde en riskli olanıdır. Bu yaralanmalarda enfeksiyöz ajanların derinin koruyucu tabakalarını atlayıp doğrudan dolaşıma ulaşarak, kişiyi enfekte etme riski yüksektir.

-Sıçrama ve temas: Çalışmalar sırasında enfeksiyöz materyal sıçrayabilir ve önlem alınmadığı takdirde deri ve mukozalara temas edebilir. Örneğin, sıçrama olmuş ve dekontamine edilmemiş bir yüzeye dokunduktan sonra, elin göze ve/ veya ağza götürülmesi ile bulaşma olabilir. Aerosol riski olan işlemlerin çoğunda sıçrama riskinin olduğu da unutulmamalıdır.

17.03.02.03. Ağız Yoluyla Bulaşı

Ağız yoluyla bulaşının en önemli nedeni ağızla pipetlemedir. Ayrıca çalışmalar sırasında enfekte materyalin ağza sıçraması, kontamine materyalin ya da elin ağza götürülmesi, laboratuvarda yiyecek ve içecek tüketilmesi bulaşı riskini çok yükseltir.

Önlem;

-Mikrobiyoloji çalışması yapılan laboratuvarlar sahip oldukları biyogüvenlik düzeyine uygun şekilde tasarlanmalı ve güvenlik için gerekli tüm fiziksel şartlar oluşturulmalıdır.

-Girişler kısıtlanmalı ve uygun uyarıcı işaretlemeler yapılmalıdır.

-Laboratuvarda çalışacak kişiler, yapılan işler, riskler ve koruyucu önlemlerle ilgili mutlaka mesleki eğitim almalı ve bilinçlendirilmelidir.

-Laboratuvar giriş-çıkışlarında kişisel hijyen kurallarına uyulmalıdır.

-Çalışma ortamında çalışmaya başlamadan ve çalışma bittikten sonra gerekli hijyen ve dekontaminasyon kurallarına uyulmalıdır.

-Kişisel eşyalar laboratuvar ortamına sokulmamalı, laboratuvara ait hiçbir eşya veya malzeme dışarı çıkartılmamalıdır.

-Çalışmalar sırasında laboratuvarın sahip olduğu Biyogüvenlik Düzeyine uygun kişisel koruyucu donanım kullanılmalıdır.

-Aerosol bulaşışına karşı N95 veya FFP3 partikül maskeli filtre takılmalıdır.

-Kullanılan önlükler sıçramalara dayanıklı, önü kapalı ve kolları büzgülü olmalıdır.

-Biyogüvenlik düzeyi 2'den büyük laboratuvarlarda eldivenler önlüğün kol manşetlerinin üstüne çıkartılarak takılmalıdır.

-Tüm pipetleme işlemlerinde pipet yardımcıları ve pamuk bariyerli serolojik pipetler kullanılmalıdır.

-Eğer mümkünse Bunsen beki yerine insineratör kullanımı tercih edilmelidir.

-Kesici-delici atıklar sert yapılı ayrı kaplarda toplanmalı ve bertaraf etmeden önce dekontamine edilmelidir.

-Tüm katı ve sıvı atıkları ayrı olarak toplanmalı ve bertaraf etmeden önce malzemenin özelliğine uygun olacak şekilde dekontamine edilmelidir.

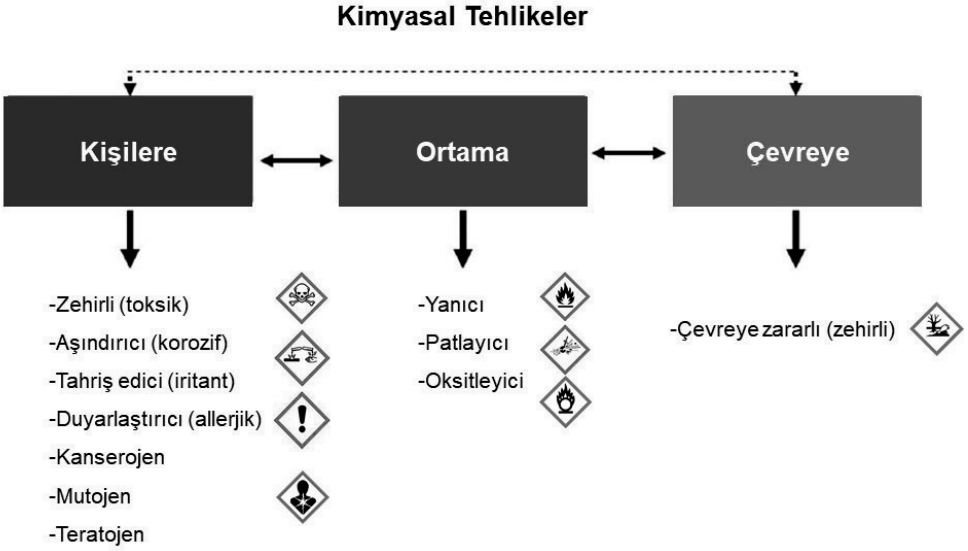
17.03.03. Kimyasal Tehlikeler

Laboratuvarlarda analizi gerçekleştirmek için gerekli reaktifler haricinde temizlik için kullanılan deterjan ve dezenfektanlar da dahil olmak üzere pek çok farklı kimyasal madde kullanılmaktadır. Kimyasallar kişilere, ortama ve çevreye tehlikeli olabilirler.

Bu kimyasal maddelere maruz kalınması durumunda kimyasal madde teması olan vücut bölgelerinde (göz, deri, solunum yolu, vb.) lokal etkiler, temas bölgesinden emilerek dolaşım sistemine karışması sonucu yaygın etkiler gözlenebilir.

Lokal ve sistemik etkiler bir arada görülebileceği gibi kimyasalların etkileri bulaşı yolu, doz ve temas süresine bağlı olarak akut veya kronik olarak ortaya çıkabilir. Bu etkiler iritasyondan kansere ve ani ölümlere kadar gidebilen bir spektrumda gerçekleşebilir. Laboratuvar çalışanları kimyasallara solunum yolu, deri/mukoza yolu, ağız yolu ile maruz kalabilirler. Kimyasal maruziyet sonucu gözlenen etkinin şiddeti ve çeşidi ise;

-Maruziyet yolu
-Maruziyet süresi ve dozu,
-Maddenin zararlı etkisi,
-Zararlı etkiye neden olan kontaminasyon miktarına göre değişir.



Şekil 17.01. Kimyasal tehlikeler ve tehlike etiketleri

17.03.03.01. Solunum Yolu (Aerosoller) ile Maruziyet

Kimyasal gazlara, kimyasal gaz buharlarına, uçucu kimyasallara solunum yolu ile maruz kalınabilir. Akciğerlerde lokal etkinin yanı sıra sistemik etki oluşturabilirler. Gaz ve buharın solunum yolundan emilimi;
-Kimyasalın buhar basıncına
-Solunan hava içerisindeki konsantrasyonuna
-Kimyasalın yapısal özelliklerine (moleküler yapı, vücut sıvılarında çözünürlük, partikül büyüklüğü) bağlıdır.

Kimyasalın buhar basıncı ne kadar yüksek olursa havadaki konsantrasyonu da o ölçüde artar. Solunan kimyasal toksik ise, düşük buhar basıncına sahip olsa bile tehlike oluşturur.

17.03.03.02. Temas Yolu ile Maruziyet

Temas yolu ile maruz kalma, kimyasalın sıçraması, dökülmesi veya bilinçli olarak dokunulması yoluyla ciltten ve mukozadan (göz, ağız, burun) emilim sonucunda gerçekleşir. Deride çatlak, kesi, döküntü gibi bir hasar olması kimyasalların penetrasyonunu artırır. Fenol gibi bazı kimyasallar sağlam deriden de geçebilirler. Deriden emilim kimyasalın konsantrasyonuna, reaktivitesine, su ve yağda çözünürlüğüne, temas süresine ve temas bölgesine göre değişir.

Kimyasalların deri ile teması sonrasında kaşıntı, kızarıklık, kuruluk, deride renk değişikliği, döküntü ve içi su dolu kabarcık oluşumu gözlenebilir. Güçlü asit ve bazlar ile kimyasal yanıklar oluşabilir. Kimyasalların gözle temasında çoğunlukla ağrı ve iritasyon, bazı durumlarda ise önemli ölçüde yanık ve görme kaybına neden olabilir. Temas yolu ile oluşan hasarlar doku ve organ kayıplarına kadar gidebilir.

Önlem;

-Laboratuvarda çalışacak kişiler, yapılan işler, riskler ve koruyucu önlemlerle ilgili mutlaka mesleki eğitim almalı ve bilinçlendirilmelidir.

-Kullanılacak kimyasalın etiket bilgileri ve Malzeme Güvenlik Bilgi Formu (MGBF) incelenerek kullanmadan önce mutlaka kimyasalın zararları, korunması için kullanılması gereken kişisel koruyucu donanımlar, acil durumda yapılması gerekenler ve bertaraf bilgileri hakkında bilgi sahibi olunmalıdır.

17.03.03.03. Ağız Yolu ile Maruziyet

Genellikle kontamine cisimlerin ağza götürülmesi veya ağızla pipetleme sonucu bulaş gerçekleşir. Laboratuvarda yiyecek, içecek ve sigara tüketilmesi riski artırır.

Emilim kimyasalın fiziksel özelliklerine ve çözünme hızına bağlıdır. Kimyasala maruz kalma yolunun yanı sıra kimyasala maruz kalma süresi ve dozu, kimyasal maddenin zararlı etkisi (toksik, karsinojenik, vb.) ve bu zararlı etkiye neden olan miktarı da (Letal doz: LD_{50}, vb.) önemlidir. Kimyasalların tehlike özelliklerine göre etkileri, bazen maruziyeti takiben hemen ortaya çıkar bazen de ciddi sağlık sorunu veya meslek hastalığı şeklinde zamanla görülebilir.

17.03.04. Ergonomik Tehlikeler

Çalışanlara sağlıklı bir çevrenin oluşturulması için ergonomik bir çalışma ortamı önemlidir. Özellikle uzun süre aynı işi yapan çalışanlar risk altındadır. Laboratuvar uygulamaları, ileri derecede yineleme özelliği taşıyan, statik postürü zorlayan hareketler ve duruşlar içermektedir. Uzun süreli tekrarlayan işlerde çalışma ortamı dizaynı, çalışma süresi ve kullanılan aletler ergonomiyi etkileyen temel faktörlerdir.

Uygun olmayan bilinçsiz bir çalışmanın temel belirtileri;

-Yanma, kramp
-Parmak, bilek şişmesi, karıncalanması
-Kol, dirsek, boyun ve omuz ağrıları
-Bel ağrısı
-Uyuşma, güçsüzlük veya yorgunluk önemli bulguları arasındadır.

Önlem;

-Çalışma ortamı yapılan işe uygun olarak dizayn edilmelidir. Yapılan iş uzun süreyle ters harekete, uzanmaya, dönmeye neden olmamalıdır.

-Tekrarlayan işlerde her 30 dk'da bir ara verilmelidir.

-Çalışanlar uygun kaldırma yöntemleri konusunda eğitilmeli, iş dizaynı kaldırma ve taşımaları minimize edecek şekilde planlanmalıdır.

-Laboratuvar sandalyesi kullanılıyor ise sandalye boyu ayarlanabilmeli, sandalye 360º dönebilmeli ve üzerinde ayarlanabilir ayak koyma çemberi bulunmalıdır.

-Oturarak çalışma minimize edilmelidir. Ayakta çalışma oturarak çalışmaya göre daha az yorgunluk getirir.

-Ayakta çalışmalarda basıncı dengeleyen, uzun süreli ayakta çalışmada yorgunluk hissini azaltan basınç absorbe edici matlar veya ergonomik ayakkabılar kullanılmalıdır.

-Tekrarlanan işleri yapan çalışanlar diğerleri ile rotasyona girmeli ve böylece çalışanların aynı kaslarının kullanılması ve sıkıcılık önlenmelidir.

17.03.05. Acil Durumlar

Yerel mevzuatımızda acil durum, "işyerinin tamamında veya bir kısmında meydana gelebilecek yangın, patlama, tehlikeli kimyasal maddelerden kaynaklanan yayılım, doğal afet gibi acil müdahale, mücadele, ilkyardım veya tahliye gerektiren olaylar" olarak tanımlanmaktadır. Laboratuvarlarda çok sayıda farklı acil durum ortaya çıkabilir. Acil durumları doğal afetler ve kazalar olarak ikiye ayrılabilir.

Doğal afetler insanların kontrolü dışında gerçekleşen, doğa olaylarına bağlı afetlerdir. Doğal afetler her yerde olduğu gibi laboratuvarlar için de acil durumların ortaya çıkmasına neden olur. Örneğin depremin yıkıcı etkileri yanı sıra deprem sırasında biyolojik ajanların ve tehlikeli kimyasalların çevreye kontrolsüz biçimde yayılma riski söz konusudur.

Laboratuvardaki biyolojik, kimyasal ve fiziksel tehlikeler de acil durumlara neden olabilir. Bunlar arasında dökülme saçılmalar, biyolojik ajanlara ve kimyasallara maruz kalma, yangın, patlama, elektrik şoku gibi yaralanma, enfekte olma, sakat kalma hatta ölüme kadar gidebilecek sonuçları olabilen kazalar sayılabilir.

Bu tür olayların belirlenmesi için işyerlerinde risk değerlendirmesi yapılması gerekmektedir. Risk değerlendirmesi yapılırken yangın, tehlikeli kimyasal ve biyolojik maddelerden kaynaklanan yayılım, patlama olasılığı, ilk yardım ve tahliye gerektirecek olaylar, doğal afetlerin ve sabotajın meydana gelme olasılığı da göz önüne bulundurulmalıdır. Yapılan bu risk değerlendirmesinin ardından yapılması gereken diğer önemli bir iş, acil durum planlamasıdır. Tehlikeli materyaller (biyolojik, kimyasal, radyoaktif) ile çalışan her laboratuvar acil durumlar için hazırlıklı olmalı ve bir acil durum eylem planı hazırlamalıdır.

17.03.05.01. Laboratuvar Kazaları, Dökülme ve Saçılmalar

Laboratuvardaki biyolojik, kimyasal ve fiziksel tehlikeler acil durumlara neden olabilir. Laboratuvarlarda karşılaşılabilecek kazalar ve durumların başında "biyolojik dökülme ve saçılmalar", "enfeksiyöz aerosollere maruz kalma", "kesici-delici yaralanmalar", "kimyasal dökülme ve saçılmalar", "elektrik şoku" ile "yangın ve patlamalar" gelir. Bu kazalar yaralanma, akut ve kronik enfeksiyon, sakat kalma hatta ölümle sonuçlanabilir.

Kazalar küçük ölçekli ve sınırlı olabileceği gibi büyük ölçekli, çalışanların yaşamını riske eden ve tahliye gerektirecek boyutta olabilir. Her iki kategoriye verilecek yanıt doğal olarak farklıdır. Dolayısıyla, öncelikle bir durum/risk değerlendirilmesi yapılarak olayın boyutu ve riskler belirlenmelidir. Ardından, olayın gerektirdiği biçimde eyleme geçilmeli ve en son aşamada da olay yetkililere bildirilmelidir.

Acil durumlara müdahale ederken öncelikler sırası gözetilmelidir. İlk öncelik daima insandır. İkinci öncelik, eğer varsa ortamdaki hayvanlardır. Üçüncü öncelik ekipman ve tesisin kurtarılmasıdır.

17.03.05.01.01. Biyolojik Dökülme ve Saçılmalar

Biyolojik materyalin dökülmesi ve saçılması öncelikle ortamda bulunan çalışanlar açısından ciddi bir enfeksiyon riski doğururken aynı zamanda da dökülme yerine ve şekline bağlı olarak çevre için de potansiyel risk oluşturur.

Alınan önlemlere karşın çalışma ortamında biyolojik bir dökülme-saçılma gerçekleşirse olaya en kısa sürede ve güvenli biçimde müdahale edilmesi temel hedef olmalıdır. Bu amaçla laboratuvarlarda her zaman hazırda "Biyolojik Acil Durum Kiti" bulunmalıdır. Biyolojik Acil Durum Kiti içerisinde temel olarak kişisel koruyucu donanım, sınırlayıcı ve emici malzeme, dezenfektanlar ile temizlik ve atık ekipmanları hazırda bulunmalıdır (bknz⇒ Ek B39).

Biyolojik dökülme ve saçılma sonucu oluşabilecek riskler şöyle özetlenebilir

- -Çalışanlar ve ortamda bulunanlar
  - -Aerosollerin solunması
  - -Mukozalara sıçrama
  - -Deriye temas
  - -Kesici-delici cisim batması ile bulaşı
- -Çevre
  - -Aerosol yoluyla çevreye yayılma
  - -Temizlik sırasında çevreye yayılma

Bütün biyolojik dökülme-saçılma olayları çalışanlar için aynı riski oluşturmaz. Dolayısıyla biyolojik dökülme-saçılmalara müdahale ederken önce bir risk değerlendirmesi yapılmalı ve alınması gereken önlemler buna göre şekillendirilmelidir.

İlk olarak biyolojik materyale maruz kalan olup olmadığı, dökülen sıvının miktarı ve dökülme yeri durumları değerlendirilmelidir. Daha sonra dökülen biyolojik materyale müdahale etme sırası kişisel koruyucu donanım kullanımı, sınırlama ve emdirme, dezenfekte etme, temizleme ve raporlama aşamalarından oluşmalıdır (bknz⇒ Ek B41).

17.03.05.01.02. Kimyasal Dökülme ve Saçılmalar

Kimyasalların dökülmesi veya saçılması kişiye doğrudan temas ile zarar verebileceği gibi dökülme sonrası ortaya çıkan zararlı, toksik buharlar çevrede bulunan diğer kişileri de etkileyebilir. Bunun dışında kimyasalın türüne bağlı olarak çevreye zarar verebilir.

Bu zararlı etkileri ortadan kaldırmak için dökülme-saçılma durumunda olaya en kısa sürede ve güvenli biçimde müdahale edilmesi önemlidir. Bu amaçla laboratuvarlarda her zaman hazırda "Kimyasal Acil Durum Kiti" bulunmalıdır. Kimyasal Acil Durum Kiti içerisinde temel olarak kişisel koruyucu donanım, sınırlayıcı ve emici malzeme, nötralizanlar ile temizlik ve atık ekipmanları hazırda bulunmalıdır (bknz⇒ Ek B40).

Kimyasal dökülme ve saçılma sonucu oluşabilecek riskler şöyle özetlenebilir

-Çalışanlar
  -Sıçrama sonucu temas yoluyla
  -Buhar ve aerosol sonucu solunum yoluyla

-Ortamda bulunanlar
  -Uçucu zararlı/ toksik buhar oluşumu yoluyla

-Çevre
  -Kimyasalın türüne bağlı olarak patlama/ yangın/ çevre kirliliği sonucu

Herhangi bir kimyasal dökülme durumunda öncelikle panik yapılmamalı ve riskler değerlendirilmelidir. Dökülen maddenin ne olduğu ve riskleri biliniyorsa (etiketinden ne olduğu okunabiliyorsa ve dökülen kimyasala ait bir güvenlik bilgi formu laboratuvarda bulunuyorsa), dökülmenin basit bir dökülme olup olmadığına karar verilir. Basit bir dökülme ise ve laboratuvar çalışanı kendini riske etmeden müdahale edebileceğini düşünüyorsa kimyasal dökülme-saçılma kitini kullanarak müdahale gerçekleştirilir ve olay bildirim formu doldurulur (bknz⇒ Ek B42).

17.04. Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Karşılaşılan Tehlikeleri Önleme

Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan işlemlerde önlem alınmadığı takdirde enfeksiyon riski vardır. Bazı işlemlerde risk diğerlerinden daha fazladır. Bu risk özellikle aerosol oluşturan işlemlerde belirgin olarak artar. Laboratuvardaki

biyolojik riskler temel olarak iki faktörden etkilenir. Bunların ilki, çalışılan mikroorganizmadan kaynaklanan risklerdir. Bu riskler, mikroorganizmanın patojenitesi, enfeksiyon oluşturma dozları, bulaşı yolu ve dış ortamda stabilitesi gibi unsurlarla ilişkilidir. Biyolojik riskleri etkileyen ikinci faktör ise yapılan işleme bağlı risklerdir. Örneğin, işlem sırasında aerosol oluşturan basamakların varlığı (santrifüjleme, vorteksleme, pipetleme, vb.) ya da kesici-delici cisim kullanılması (enjektör kullanılarak pasaj yapılması, vb.) mikroorganizmalara temas riskini attırır. Dolayısıyla, laboratuvarlarda her iki risk faktörü de dikkate alınmalı ve kontrol önlemleri bu bakış açısıyla şekillendirilmelidir. Genel olarak risk grupları ile biyogüvenlik düzeyleri (BGD) arasında bir ilişki vardır. Çalışılan mikroorganizmaların risk düzeyi arttıkça, bunların çalışılması gereken biyogüvenlik düzeyi de artar.

Laboratuvar için belirlenen biyogüvenlik düzeyleri (BGD) çerçevesinde çalışan ve çevre güvenliğini sağlamaya yönelik çalışma ortamlarının fiziksel şartları, kullanılması/bulundurulması gereken güvenlik donanımları ve gerekli uzmanlık eğitimleri belirlenmeli ve sağlanmalıdır.

17.04.01. Laboratuvarlar için Genel Güvenlik Prensipleri

Laboratuvar genel güvenlik prensipleri, mikrobiyolojik materyalle çalışılan laboratuvarlarda çalışanların ve çevrenin güvenliği açısından gözetilmesi ve uyulması gerekli temel kuralları ve uygulamaları içerir. Bu kuralların temel mantığı mikroorganizmaların bulaşmasını önlemektir.

Kendi güvenliğiniz önceliklidir!

-Hiçbir çalışan hiçbir koşulda kendini riske atmamalıdır, ancak içinde bulunduğu durum güvenli ise olaya müdahale etmelidir.

-Laboratuvarda hiçbir koşulda yalnız çalışılmamalıdır.

Giriş çıkış sınırlamalarına uyun!

-Biyolojik Risk Düzeyi 2 ve daha yüksek olan mikroorganizmaların çalışıldığı oda kapılarında “Biyolojik tehlike” uyarı işareti bulunmalıdır.

-Laboratuvarda kültür ve örneklerle ilgili işlemler yapılırken laboratuvar kapıları kapalı tutulmalıdır.

-Laboratuvara yetkili olmayan kişilerin girişine engel olunmalı, çocukların laboratuvar çalışma alanlarına girmesine izin verilmemelidir.

-Laboratuvar hayvanları hariç hiçbir hayvan ve bitki laboratuvara sokulmamalıdır.

Kirli ve temiz alanları birbirinden ayırın!

Laboratuvarda teknik işlerin yapıldığı alanlar ve çalışma alanlarındaki tüm yüzeyler (cihazlar, banko yüzeyleri, klavyeler, atıklar, vb.) kirli olarak kabul edilir.

-Kişisel koruyucu donanımlar kirli alanların girişinde bulunmalı, laboratuvara giriş-çıkışta giyilip çıkartılmalıdır ve eller yıkanmalıdır.

-Kirli ve temiz zeminlerin geçiş hattı renkli (sarı, turuncu veya sarı-siyah çizgili) bir bantla işaretlenmelidir.

-Kirli alanlardan temiz alana mümkünse materyal (telefon, saat, bilgisayar, evrak, vb.) getirilmemelidir, getirilen materyaller dekontamine edilmelidir.

-Temiz alanlara kültür, vb. enfektif materyaller getirilmemelidir.

-Kişisel eşyalar (çanta, vb.) için temiz bir alan ayrılmalı ve kişisel eşyalar temiz alanda bırakılmalıdır.

-Kirli alanda yiyecek saklanmamalı, herhangi bir şey yenip içilmemeli ve makyaj yapılmamalıdır.

Çalışma Ortamınızı Sadeleştirin!

-Laboratuvardaki tüm alanlar ve bankolar gereksiz şeylerden arındırılmalıdır. Kalabalık ortamlar kaza riskini arttırır.

-Tehlikeli kimyasallarla çalışırken, analize yetecek miktar bir kaba alınmalı ve stok çözelti şişesi ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Eğer mümkün ise kimyasal tüketim miktarını azaltılmalıdır.

El yıkama ve kişisel hijyene önem verin!

-Enfektif materyalle çalıştıktan sonra ve laboratuvar alanlarını terk etmeden önce eller yıkanmalıdır.

-Laboratuvarda kontak lens takılıp çıkartılmamalıdır.

-Kontak lens kullananlar çalışma sırasında koruyucu gözlük kullanmalıdır.

-Elde yara / kesik varsa su geçirmez bant ile kapatılmalıdır.

-Çalışma sırasında saçlar toplanmalı, elde yüzük vb. takı olmamalı ve tırnaklar kısa kesilmelidir.

Sağlık durumunuz hakkında laboratuvar sorumlusuna bilgi verin!

-Gebelik ve bağışıklığı baskılayıcı tedavi görülmesi (ör: kortikosteroid kullananların mikrobiyoloji laboratuvarlarında veya enterik patojenlerin çalışıldığı laboratuvarlarda çalışmaları riskli olabilir) durumunda yönetim bilgilendirilmelidir.

Kişisel Koruyucu Donanım (KKD) kullanın!

-Laboratuvarda yapılan işe uygun önlük ya da diğer koruyucu giysiler giyilmelidir.

-Yapılan işe uygun eldiven kullanılmalı ve biyolojik materyaller ile çalışırken daima eldiven giyilmelidir.

-Sıçrama riski olan tüm işlemlerde gözlük, yüz siperi ve gerekli diğer koruyucu donanım kullanılmalıdır.

-Risk değerlendirmesine göre gerekli durumlarda maske ve diğer KKD kullanılmalıdır.

-Laboratuvarda önü açık ayakkabı ya da terlik giyilmemelidir.

Aerosol ve sıçramalara karşı önlem alın!

-Enfektif aerosol riski olan işlemler Biyogüvenlik Kabinlerinde (BGK) yapılmalıdır.

-Özelerin sterilizasyonu açık alevde yakılarak yapılmamalıdır. Bunun yerine insineratör (Ek B52) veya tek kullanımlık özeler kullanılmalıdır.

-Öze halkasının çapı, taşınan sıvının damlamaması için, 2-3 mm olmalı ve halka tamamen kapalı olmalıdır. Öze telinin vibrasyonunu en aza indirgemek için uzunluğu 6 cm'den fazla olmamalıdır.

-Enfektif aerosol riski olan santrifüjleme işlemlerinde güvenlik kapağı olan santrifüj kapları veya rotorları kullanılmalıdır.

-Aerosollerle bulaş riski taşımayan örneklerle çalışırken saçılma ve sıçramalara karşı güvenlik siperleri ve/veya KKD kullanılabilir.

-Tüm teknik prosedürler, aerosol ve damlacık oluşumunu en aza indirecek şekilde tasarlanmalı ve uygulanmalıdır.

-Kültür plakları kesinlikle koklanmamalıdır.

-Biyolojik dökülme-saçılmalara müdahale ederken önlük ve eldiven yanı sıra aerosolizasyon ve sıçrama risklerine karşı partikül filtreli maske, gözlük, vb. KKD kullanılmalıdır.

Kesici-delici yaralanmalara karşı önlem alın!

-Kesici delici malzemenin kullanılması mümkün olduğunca sınırlandırılmalı, cam malzeme yerine plastik malzeme tercih edilmelidir.

-Kesici-delici aletler kullanılmak zorunda ise gerekli önlemler alınmalıdır.

-Kesici-delici aletler delinmeye ve sızdırmaya dayanıklı kesici-delici atık kaplarına atılmalıdır.

Güvenli pipetleme yapın!

-Ağızla pipetleme yapılmamalıdır. Daima pipetleme yardımcıları kullanılmalıdır.

-Serolojik pipetlerde pamuk tıkaçlı olanlar tercih edilmelidir.

-Pipetleme sırasında aerosolizasyonu önlemek için önlemler alınmalıdır. Pipet ucu tüpün iç kenarlarına temas ettirilerek sıvı yavaşça tüp duvarından kaydırılmalıdır.

-Mikropipet uçları atılırken sıçrama ve aerosolizasyon riski vardır. Atma işlemi pipet uçları için kullanılan atık kabının içinde gerçekleştirilmelidir.

Laboratuvar cihazlarını güvenli biçimde kullanın!

-Biyolojik ve fiziksel tehlikelere karşı önlemler alınmalıdır.

-Santrifüj, vorteks, homojenizatör, otoklav, ısıtıcılı karıştırıcı, sıcak su banyosu vb. gibi laboratuvar cihazlarının üzerinde kullanım talimatları okunacak şekilde bulunmalıdır. Kullanım talimatları kullanıcıyı ayrıntılı ve adım adım olacak şekilde yönlendirecek şekilde oluşturulmalıdır.

Tehlikelere karşı görsel, işitsel uyarılar kullanın ve sürekli iletişim içinde olun!

-Gerekli tüm yerlerde tehlike ve uyarı işaretleri kullanılmalıdır.

-Tüm çalışanlar, bu uyarı ve işaretlerin anlamı ve almaları gereken önlemler konusunda bilgilendirilmelidir.

Kimyasalları güvenli biçimde saklayın, taşıyın, kullanın ve bertaraf edin!

-Kimyasallar tehlike sınıflarına ve geçimliliklerine göre saklanmalı ve taşınmalıdır.

-Kimyasallar laboratuvar içinde küçük miktarlarda bulundurulmalı ve aşındırıcılar (kuvvetli asit ve bazlar) göz hizasının altında saklanmalıdır.

-Tehlikeli kimyasallar çeker ocak içinde çalışılmalıdır.

-Yanıcı-parlayıcı maddelerle çalışırken ısı kaynaklarından uzak durulmalı ve yangın önlemleri alınmalıdır.

-Tehlikeli kimyasal atıkları uygun şekilde toplanmalı ve ilgili yönetmelik uyarınca bertaraf edilmelidir.

Fiziksel tehlikelere karşı önlem alın!

-Laboratuvarda elektrik, yangın, düşme ve kayma, gürültü gibi fiziksel tehlikelere karşı önlemler alınmalıdır.

Yüzeyleri, cihazları ve atıkları dekontamine edin!

-Çalışma yüzeyleri, potansiyel olarak tehlikeli materyallerin dökülmesinden sonra, her çalışma sonrası ve her iş gününün sonunda dekontamine edilmelidir.

-Kontamine olmuş tüm materyaller, örnekler ve kültürler bertaraf edilmeden ya da yeniden kullanım için temizlenmeden önce dekontamine edilmelidir. Atıklar ilgili yönetmelikler doğrultusunda bertaraf edilmelidir.

-Cihazlar belirli aralıklarla ve dökülme-saçılma durumlarında üretici firmanın önerileri doğrultusunda dekontamine edilmelidir.

-Laboratuvarda biyolojik dökülme-saçılma kiti bulundurulmalı ve tüm çalışanlar bu tür durumlarda ne yapacakları konusunda eğitilmiş olmalıdır.

-Telefonlar enfektif ajanları yüze ve mukozalara taşımak için potansiyel bir aracıdır. Bu nedenle telefona kesinlikle eldiven çıkarılarak dokunulmalı, düzenli ve sık olarak dekontamine edilmelidir.

17.04.02. Tehlike/ Risk Kontrolü

Laboratuvarlarda olası tehlikelere göre kontrol önlemleri alınır. Risk değerlendirme, alınan bu önlemlerin yeterli olup olmadığını, ek önlemlere gerek olup olmadığını gösterir. Laboratuvara yeni bir ekipman geldiğinde, çalışma prosedürü değiştiğinde, yeni bir çalışan ekibe katıldığında ya da çalışılan materyalin niteliğinde bir değişiklik olduğunda risk değerlendirmenin mutlaka yinelenmesi ve ek önlemler alındıktan sonra etkinliğinin denetimi gerekir.
Tehlike ya da risk kontrolü başlıca 4 düzeyden oluşur.

17.04.02.01. Tehlikeliyi Tehlikesizle Değiştirme

Tehlike oluşturacak bir işlemin veya kullanılan tehlikeli bir malzemenin/cihazın tehlikesiz olanla ya da daha az tehlikeli olanla değiştirilmesidir. Bu en iyi ve en etkin ancak uygulanması en zor kontrol yöntemidir.

17.04.02.02. Mühendislik Önlemleri

Tehlikeyi kaynağında sınırlandırmayı hedefleyen önlemlerdir. Mühendislik önlemleri aslında kişileri ve çevreyi korumaya yönelik laboratuvar tasarımlarıdır. Örneğin, tehlikeli mikroorganizmalarla bulaş riski olan işlemlerin biyogüvenlik kabininde (BGK) yapılması bir mühendislik kontrolüdür. Çünkü BGK patojenlerin etrafa yayılmasını engeller ve kaynağında sınırlandırmaya katkı sağlar. Benzer biçimde, kesici-delici atık kabı da bir mühendislik kontrolüdür, çünkü bu kaplar kesici cisimleri fiziksel olarak dış ortamdan ayırarak, çalışanlara zarar vermesini engeller. Tehlikeli kimyasallarla çalışırken çeker ocak kullanılması ya da yanıcı-parlayıcı kimyasalların yangına dayanıklı özel dolaplarda saklanması da mühendislik kontrolü örnekleridir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki tek yönlü hava akımını sağlayan havalandırma-iklimlendirme sistemleri de patojenlerin daha yüksek hava basıncına sahip dış ortama kaçmasını engellediğinden bir mühendislik kontrolüdür.

17.04.02.03. Yönetsel Önlemler

Yönetim sorumluluğunda olan ve işleyişle ilişkin yazılı kural ve uygulamaların oluşturulmasını, eğitimleri, risk değerlendirme çalışmalarını ve çalışan sağlığının izlenmesi gibi kontrol önlemlerini içerir. Bu önlemler iş güvenliğinin temelini oluşturan kontrol önlemleridir.

17.04.02.04. Kişisel Koruyucu Donanımlar

Dördüncü düzey kontrol önlemleri ise kişisel koruyucu donanımların kullanılmasını kapsar. Kişisel koruyucu donanım (KKD) kişi ile tehlike arasında bir engel oluşturarak kişiyi tehlikelerden koruyan ekipmandır. Bunlar arasında laboratuvar giysileri (önlükler, vb.), eldivenler, maske ve respiratörler, gözlük ve yüz siperleri sayılabilir. Kişisel koruyucu donanım tehlike kontrol hiyerarşinin en altında yer alır. Bu, kişisel koruyucu donanımların diğer kontrol önlemlerinin (mühendislik ve yönetsel önlemler) yerini alamayacağı ve ancak diğer koruyucu önlemler ile birlikte kullanıldığında korunmaya katkı sağlayacağı anlamına gelir.

Çalışma sırasında hangi tip koruyucu donanım kullanılacağı:

-Tehlikenin türüne (biyolojik, kimyasal, fiziksel...),

-İşin niteliğine (aerosol oluşturan işlemler, tehlikeli kimyasal kullanımı, kesici delici araç kullanımı, vb.),

-Bulaşı veya maruz kalma yoluna (solunum yolu, deri yolu, mukoza yolu, vb.)

-Maruz kalma olasılığına,

-Kişisel özelliklere (lateks alerjisi, kontak lens kullanımı, vb.) bağlı olarak farklılık gösterebilir.

Bu nedenle, her iş için risk değerlendirmesi yapılmalı ve gerekli kişisel koruyucu donanım belirlenmelidir. Seçilecek KKD'ler çalışanın kullanımına uygun, rahat ve laboratuvar içerisinde kolay ulaşılabilir bir yerde olmalıdır. Ayrıca kullanımdan önce laboratuvar çalışanlarına söz konusu kişisel koruyucu donanımların nasıl

kullanılacağı, hangi durumlarda kullanılacağı ve kısıtlılıklarını içeren uygulamalı bir eğitim verilmelidir.

Laboratuvar yönetimi çalışanlara gerekli kişisel koruyucu donanımı yeterli miktarda sağlamakla yükümlüdür. Çalışanın da bu koruyucu donanımı kullanma ve koruma sorumluluğu vardır.

Genel bir kural olarak kişisel koruyucu donanım hiçbir şekilde laboratuvardan dışarı çıkartılmamalı sadece laboratuvar içinde kullanılmalıdır.

18. KAYNAKÇA

Derleme yayın niteliğindeki bu kitabın hazırlanmasında tam olarak yüzlerce kaynaktan yararlanılmıştır. Günümüzde yeni bilgilere elektronik ortamda çok kolaylıkla erişilebilmektedir. Bu kitabın yayımlandığı tarihte kullanılmış olan literatürün bir kısmı, hemen yarın eskimiş ve güncelliğini yitirmiş olacaktır. Dolayısıyla kullanılan tüm kaynakların listelenmesi gerekli görülmemiştir, ancak

-Baskı tarihleri çok eski olsa da "Ustaya saygı" ve tarihe not düşmek adına elimizdeki Türkçe kaynaklar listelenmiştir.

-Ustaya saygıyı, sadece hocalarımızın kitapları ile sınırlı bırakmadık. Kendileri ile birlikte çalışırken beraberce çok şey öğrendiğimiz öğrencilerimizin çalışmalarını da gurur duyarak bu listeye ekledik.

-Editörü olan çoklu yazarlı temel mikrobiyoloji kitaplarını, sadece editör adı ile listeledik.

Meslektaşlarımızın aşağıda web adresleri verilmiş olan siteleri sürekli olarak incelemeleri ve güncel gelişmeleri bu sitelerden izlemeleri önerilir. Besiyeri üreten ticari firmaların web adresleri, zaman içinde değişebilmektedir.

WEB siteleri:

AOAC Official Methods of Analysis (OMA). https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/

Bacteriological Analytical Manual; BAM; https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/ bacteriological-analytical-manual-bam

BBL; https://www.bd.com/en-us/offerings/capabilities/microbiology-solutions

Bergey's Manual Trust Publications; https://www.bergeys.org/publications

Biomerieux; https://www.biomerieux.com.tr

Difco; https://www.fishersci.com/us/en/brands/I9C8LUGQ/ difco-laboratories.html

Euro WHO http://www.euro.who.int/en

European Food Safety Authority; EFSA http://www.efsa.europa.eu/

Food and Drug Administration; https://www.fda.gov/

Food defence http://www.fda.gov/fooddefense

HiMedia; http://www.himedialabs.com/HML/Pages/default.aspx

International Dairy Federation; https://www.fil-idf.org/

International Fruit and Vegetable Juice Association; IFU https://ifu-fruitjuice.com/

International Organization for Standardization; ISO; https://www.iso.org

LabM; http://www.labm.com

Laboratuvar güvenliği; http://www.laboratuvarguvenligi.com/

Merck Millipore; http://www.merckmillipore.com/TR/tr/products/industrial-microbiology/culture-media/dLWb.qB.5kgAAAFAX8JkiQpx,nav
Oxoid; http://www.oxoid.com/uk/blue/index.asp

MEGEP Gıdalarda mikrobiyolojik analizler http://www.megep.meb.gov.tr/?page=moduller

Sartorius; https://www.sartorius.com/en

Sidas Medya Gıda Kitapları http://www.gidakitaplari.com/Kitaplar/35/Gida-Kitaplari

Su mikrobiyolojisi http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/ Dosya Goster.aspx?DIL=1&BELGEANAH=4103&DOSYAISIM= SU%20MIKROBIYOLOJISI.pdf

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü;
https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü; https://hsgm.saglik.gov.tr

Yararlanılan ve okunması önerilen kaynaklar

Abbas, S.M.N. 2002. Baharat Mikroflorası Üzerine Işınlamanın Etkisi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi.

Anonymous 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. baskı (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını). Sim Matbaacılık Ltd, Ankara, 522s.

Anonymous 1992. Manuals of food quality control 4. Microbiological analysis. FAO Food And Nutrition Paper 14/4 Rev. http://www.fao.org/3/T0610E/T0610E.pdf

Anonymous 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: AK Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa.

Anonymous 2010. Gıda Işınlama. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu yayını, Ankara, 179 s.

Anonymous 2010. Mikrobiyoloji El Kitabı (Hızlı Erişim). Editörler: AK Halkman, ÖE Sağdaş, Arkadaş Matbaacılık, Ankara, 234 s.

Anonymous 2011. Gıda Mühendisliği Teknik Terimler Rehberi. TMMOB Gıda Mühendisleri Odası, Kitaplar serisi no 17, Ankara 232 s.

Anonymous 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. 29.12.2011 tarih ve 28157 sayılı Resmî Gazete.

Anonymous 2014. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Yayın Komisyonu, Laboratuvar Güvenliği Rehberi, Ankara.

Anonymous 2016. Gıda Güvenliği ve Mikrobiyolojik Riskler. Aybak Natura Analiz Laboratuvar Hizmetleri San. ve Tic. Ltd Şti. http://www.aybaknatura.com.tr/images/files/gida-g%C3%BCvenligi-ve-mikrobiyo.pdf

Anonymous 2017. Foodborn Diseases 3rd Ed., Eds CER Dodd, T Aldsworth, RA Stein, DO Cliver, HP Riemann. Academic Press Elsevier, 578 s.

Arda, M. 1978. Genel Bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları no: 342. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 521 s.

Atlas, R.M. 1996. Microbiological Culture Media 4th Ed. CR Press, New York 2040 p.

Bağder Elmacı, S. 2015. Lignoselülozik Biyokütleden Biyoetanol Üretimi Sırasında Ön İşlem Koşullarının Etanol Verimine Etkisi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD. Doktora Tezi.

Baran Ekinci, M. 2008. İşlenmiş ve İşlenmemiş Bazı Mısır Ürünlerinde Genetik modifikasyonun Tespiti. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD. Doktora Tezi.

Baş, M. 2004. Besin Hijyeni Güvenliği ve HACCP. Sim Matbaacılık Ltd. Şti, Ankara, 502 s.

Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. (Eds) 2005. Food Microbiology and Laboratory Practice. Blacwell Science 324 s.

Beşe, M. 1974. Mikrobiyolojide Kullanılan Biyokimyasal Testler ve Besiyerleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın no 298. 536 s.

Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G. 1995. Mikrobiyolojiye Giriş. ISVAK Yayın no: 5. 227 s.

Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G., Çakır, İ. 2011. Mikrobiyoloji. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 36, Bizim Grup Basımevi, Ankara, 227 s.

Çetin, E.T. 1983. Endüstriyel Mikrobiyoloji. Bayda Yayın No: 2, İstanbul, 418 s.

Çilak Özlük, G. Tane Karabibere Uygulanan Farklı Dekontaminasyon Yöntemlerinin Mikrobiyel Yük ve Aroma Üzerine Etkisi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi.

Çon, A.H., Gökalp, H.Y. 1997. Gıda Mikrobiyolojisi. Pamukkale Üniversitesi Basım Ünitesi, Denizli, 169 s.

Çotuk, A. 2003. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 138 sayfa kitap.

Denizel, T. 1986. Gıda Mikrobiyolojisi 1. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No: 18. Bursa, 143 s.

Doğan, H.B. 2001. Gıda Kaynaklı *Salmonella*'ların İdentifikasyonu Üzerinde Karşılaştırmalı Araştırma. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi.

Doyle, M.P., Beuchat L.R. (Eds) Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers 3rd Ed. ASM Pres. Washington D.C.
Erkmen, O. (Ed) 2010. Gıda Mikrobiyolojisi. Eflatun Basım Dağıtım Yayıncılık Ltd., Ankara, 552 s.

Erol İ. 2007. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti, Ankara, 392 s
Farmer, J. J., Howard, B.J., Weissfeld, A.S. 1987. *Enterobacteriaceae.* In Clinical and Pathogenic Microbiology (B.J.Howard ed in ch.) C.V. Mosby Comp, Washington D.C. 289-328.

Göktan, D. 1990. Gıdaların Mikrobiyal Ekolojisi. Cilt 1 Et Mikrobiyolojisi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları no 21. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 292 s.

Güler, F. (-). Yerli İzolat Bazı Bacillus Türleri Kullanılarak Farklı Gıda ve Tarım Atıklarından Ksilanaz Üretiminin Optimizasyonu. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD. Doktora Tezi (devam ediyor).

Gürgün V., Halkman, A.K. 1988. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 7. San Matbaası, Ankara, 160 s.

Güven, S. 2002. Genel Mikrobiyoloji. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. 173 s.

Güven, S., Demirel Zorba, N. N. 2016. Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu. 7. basım. Nobel Akademik Yayıncılık Ltd. Ankara, 236 s.

Halkman A.K. 2019. Gıda Mikrobiyolojisi II ders notları. Ank. Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. http://food.eng. ankara.edu.tr/wp-content/uploads/sites/256/2019/02/G%C4% B1da_mik_2_GDM310.pdf

Heperkan, D. (Çeviri Ed.) 2016. Temel Gıda Mikrobiyolojisi. Nobel Akademik Yayımcılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd., Yayın no 1636, Ankara, 608s.

İç, E. 2000. Hıyar Turşusu Salamurasında Kalsiyum Klorür Kullanarak Tuz Konsantrasyonunun Azaltılma Olanağı Üzerine Araştırma. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD. Doktora Tezi.

İşler, M. 2013. İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimleri ile Güvenlik Kültürünün İş Kazası ve Meslek Hastalıklarının Önlenmesindeki Etkisi, İş Müfettiş Yardımcılığı Etüdü, Ankara.

Karahan, A.G., Cicioğlu Arıdoğan B., Çakmakçı M.L. 2002. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fak.. Yayın no 24. 171 s.

Karakaya, A. E. 2018. Kimyasaldan Gıdaya Doz ve Risk. Artek Reklamcılık Ltd, Ankara, 160 s.

Karaoğlan, H. A. 2019. Türkiye'de Değişik Şarap Bölgelerinden İzole Edilmiş Endojen *Saccharomyces cerevisiae* Mayaları Üzerine Bazı Stres Faktörlerinin Etkisinin İncelenmesi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD. Doktora Tezi.

Kılavuz, M., Halkman, A.K. 2010. Gaz oluşum süresinin belirlenmesi ile gıdaların hızlı mikrobiyolojik analizi. GIDA 35(4)259-265.

Koçan, D. *Listeria monocytogenes*'in Belirlenmesinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi

Kozat, P. Kıymada Işınlama ve Baharat İlavesinin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* Üzerindeki Hasar Etkisi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi

Köşker, Ö., Çakmakçı, L. 1983. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Teksir no: 111. Ankara, 75 s.

Leloğlu, N., Eroğan, N. 1979. Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Atatürk Üniversitesi. Yayınları no: 549. Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, 168 s.

MacFaddin, J.F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA, 912 s.

Noveir, M.R. 1998. Gıda Kaynaklı E. coli O157:H7 Üzerine Araştırma. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi.

Öner, M. 2001. Genel Mikrobiyoloji, 4. Baskı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi no 94. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova İzmir. 380 s.

Özçelik, S. 1998. Genel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no : 1. 259 s.

Özçelik, S. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no 7. 135 s.

Özçelik, S. 2004 Gıda Mikrobiyolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın no 6. Isparta, 206 s.

Pamir, M.H. 1985. Fermantasyon Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 328 s.

Robinson, R. (Ed) 2014. Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edition. Elsevier Ltd, 3248 s.

Savran, D. 2017. Yoğurt Üretimi ve Depolaması Sırasında *Salmonella* Enteritidis'in Canlı Kalma Durumunun Modellenmesi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi.

Sekin, Y., Karagözlü, N. 2004. Gıda Mikrobiyolojisi; Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar. 4. Basımdan Çeviri. Yazan Klaus Pichhardt. Literatür Yayınları no 115. İstanbul, 358 s.

Selamoğlu, H. 2017. Gıda Maddelerinde *Salmonella* Aranmasında Laktoz Broth ve Tamponlanmış Peptonlu Su ile Önzenginleştirme Süresinin Karşılaştırılması. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Yüksek Lisans Tezi.

Şahbaz, F., Cemeroğlu, B., Acar, J. 1996. Gıda Mühendisliğinde Sterilizasyon. Düzeltilmiş 2. Baskı. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları Ders Notları No: 37. 134 s.

Şahin İ. 1990. Mikrobiyolojiye Giriş. Eser Matbaası, Samsun, 237 s.

Şahin, İ., Başoğlu, F. 2002. Gıda Mikrobiyolojisi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Ders notu no 89. 152 s

Tayar, M., Dokuzlu, C. 2007. Gıda Mikrobiyolojisi. Marmara Kitabevi, Bursa, 196 s.

Tayar, M., Hecer, C. 2007. Gıda Mikrobiyolojisi.2. baskı. Dora Yayıncılık, Bursa, 253 s.

Temiz, A. 2016. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri; yedinci Baskı. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara. 273 s.

Tokatlı, M. 2013. Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD. Doktora Tezi.

Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, 434s.

Tunail, N., Köşker, Ö. 1989. Süt Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no 1116. 138 s.

Turgay, Ö. 2017. Gıda Mikrobiyolojisi. Sidas Medya Ltd. Şti, İzmir, 261 s.

Türköz Bakırcı, G., Kayaardı, D. 2017. Mikrobiyoloji Analiz Metotları. Sidas Medya Ltd. Şti, İzmir,172 s.

Ünlütürk, A., Turantaş, F. 2002. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi 2. Baskı. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 186 s.

Wehr, H.M., Frank, J.F. (Eds) 2004. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Edition. American Public Health Association, Washington DC, 570 s.

Yaman, F. 1986. Asit ve Tuza Adapte Edilmiş *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*'in Türk Sucuklarında Yaşama Düzeyinin Belirlenmesi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi.

Yemiş Polat, G. 2011. *Cronobacter sakazakii*'nin Bebek Mamalarından İzolasyonu ve Gelişme Parametrelerinin incelenmesi. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. AbD, Doktora Tezi

İNDEKS

2 ve 3 ve sınıflı planlar; 243
ADI; 66, 434
Adlandırma; 3
Aerobic plate count (APC); 323
Aerobik solunum; 16
Aeromonas spp.; 403, 539, 588
Aerotolerant anaerop; 56
Aflatoksin; 413
Agar; 85
Alkalofil; 53
Almanya 2011 O104 salgını; 340
Alycyclobacillus spp.; 538, 588
Anaerobik solunum; 12, 17
Anaerocult; 551
Anaeroplar; 324, 505, 551
Analiz ekonomisi; 210
Analiz metotlarının geçerliği; 445
Analizde klasik yöntemler; 225
Analizlerde doğrulama; 480
Arcobacter spp.; 404
Asetik asit bakterileri; 539
Asidofil; 53
Asidotolerant; 53
Asitlendirme; 65
Aspergillus flavus; 413
Bacillus cereus; 389, 532, 583
Bebek botulizmi; 358
Besiyerinin kısmî sterilizasyonu; 152
Besiyerleri; 71
Beslenme; 44
Biyogüvenlik; 167
Biyokimyasal testler; 181
Biyolojik kontrol; 70
Biyolojik stabilite testleri; 233
Botulin; 63, 351
Campylobacter jejuni; 382, 530, 579
Canlandırma; 226
CCA besiyeri; 423
CFU; 259
Clostridium botulinum; 351, 523
Clostridium perfringens; 361, 523, 571
Clostridium tyrobutyricum; 537
Coxiella burnetii; 62
Cronobacter sakazakii; 387, 532, 582
Çift kuvvetli broth; 78
Çözeltiler; 115
Çürükçüller; 313
D değeri; 147
Damlatma (Damla kültür) yöntemi; 264
Depolama; 113
Dezenfeksiyon; 131
Doğru üretim uygulamaları; 437
Dökme plak yöntemi; 261
Durham tüpü; 79, 299
E. coli O157:H7; 333, 519, 565
E. coli; 328, 423, 514, 559
Eh; 55
Empedans (kondüktans) ölçümü; 297
EMS yöntemi; 265, 277, 283
Endüstriyel substrat seçimi; 129
Enfeksiyon; 315
Engeller teknolojisi; 440
Enterobacteriaceae, 327, 509, 558
Enterokoklar; 396, 535, 585
Enteropatojenik *E. coli* serotipleri; 331
Eurythermal; 50
F değeri; 147
Fakültatif anaerop; 56
Fekal koliformlar; 328, 513, 559
Fekal kontaminasyon; 328
Fermantasyon; 17
Fiziksel tehlikeler; 431
Fizyolojik testler; 179
Fumonisinler; 417

Fusarium spp.; 418
Gastroenterit; 348
Gaz atmosferi; 55
Gelişme kinetiği; 32
Gelişme modelleri; 24
Gelişme testleri; 179
Gelişme; 23
Gelişmenin kimyasal tanımı; 28
Gelişmeye etki eden faktörler; 43
Generasyon süresi; 25
Geri çağırma; 438
Germinasyon; 19
Gıda güvenliği; 429
Gıda kaynaklı mikrobiyel hastalıklar; 317
Gıda savunması; 430
Gıdalardaki tehlikeler; 431
Gıdaların mikrobiyolojik analizi; 223
GRAS; 66
HACCP; 435
Hava ve yüzeylerin analizi; 234, 589
Heterotrof; 4
Hijyen analizleri; 589
Homojenizasyon; 253
Hücre bileşimi; 127
Hücre gelişmesi; 39
Hücre yapıları; 6
Hy-Lite; 237
Isıl işlem; 61
Isıya dirençli küfler; 326
ISO 22000; 435
Işınlama; 67, 144
İdentifikasyon esaslı sayım; 275
İdentifikasyon; 171
İnaktivatörler; 82
İndikatör mikroorganizmalar; 320
İndirgeme, 61
İnhibitörler; 57
İnhibitörler; 57, 91
İnkübasyonda 24-48 saat kavramı; 268
İnsidans; 372
İntoksikasyon; 315
İş sağlığı ve güvenliği; 595
İzleme/ izlenebilirlik; 438
İzolasyon; 167
İzolasyonda 1:100 oranı; 169
İzolat; 168
Kalitatif metotlar; 448, 481
Kantitatif metotlar; 459, 484
Kapneik; 56
Karışımla kirletme; 494
Katkılar, 108, 115
Kaynatarak sterilizasyon; 140
Kesikli fermantasyon; 42
Kimyasal koruyucular; 65
Kimyasal madde ile sterilizasyon; 143
Kimyasal tehlikeler; 432
Kirletme prosedürü; 495
KOB; 259
Koliform grup bakteriler; 328, 423, 510, 559
Koloni; 167, 271
Kritik kontrol noktası; 437
Kserofil küfler; 48, 326, 508
Kuru sıcak uygulaması, 142
Küfler; 325, 507, 556
Kültür koleksiyonu; 207
Laboratuvar cihazları; 155
Laboratuvar güvenliği; 162, 595
Laboratuvar numunesinin hazırlanması; 250
Laboratuvar yerleşimi; 161
Laboratuvar; 153
Laboratuvarda otokontrol; 203
Laktik asit bakterileri; 401, 537
Listeria monocytogenes; 367, 525, 572
Mayalar; 325, 507, 556
Membran filtrasyon (MF); 69, 266, 291, 422

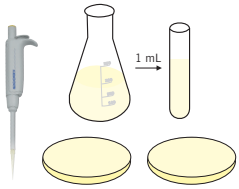
Meslek hastalığı; 596
Metabolizma; 10
Metabolizmaya dayalı sayımlar; 295
Metotların doğrulaması; 446, 480
Mezofil; 50
MF/Floresan boyama entegrasyonu; 305
Mide asitliği faktörü; 316
Mikotoksinler; 405
Mikroaerofil; 56
Mikroaerofiller; 324
Mikrobiyolojik tehlikeler; 435
Mikroorganizma analizleri; 501
Mikroskobik sayımlar; 299
Mikrotiter plak; 289
Minimal enfeksiyon dozu; 315
Monod modeli; 35
Morfolojik testler; 175
n, c, m, M kavramı; 243
Nemli sıcak uygulaması; 134
NOAEL; 66, 434
Non-Sacch besiyeri; 80, 509
Nötrofil; 53
Numune alma; 241
O/R potansiyeli; 55
Obligat aerop; 56
Obligat anaerop; 56
Okratoksin; 418
Otoklavda sterilizasyon; 135
Ototrof; 4
Ozmofilik/ ozmotolerant mayalar; 326, 508
Ölçüm belirsizliği; 446
Ön gereksinim programları; 437
Pasaj; 207
Pastörizasyon; 132
Patojenler; 314
Pearson karesi; 119
Peynirde geç şişme; 400, 537
pH ayarlama; 107
pH indikatörleri; 88
Prevalans; 368
Pseudomonas spp.; 397, 536, 586, 588
Psikrofil; 50
Psikrotrof; 50
Q fever (Q humması); 62
Risk analizi; 438
Risk grupları; 317
Risk; 431
RLU; 237
Rutin test dilüsyonu; 237
Saf kültür tekniği; 168
Sağlamlık; 479
Salmonella spp.; 341, 520, 567
Saprofitler; 313
Sayım yöntemleri; 271
Sayım; 231
Selektif inhibitör; 226
Selektif inhibitör; 226
Selektif izolasyon; 169
Selektif olmayan izolasyon; 171
Serotip; 5, 344
Seyreltme çözeltileri; 544
Seyreltme; 256
Shigella spp.; 391, 534, 587
Sıcaklık; 49
Sınıflandırma; 3
Sıvılarda mikrobiyolojik analiz; 589
Soğuk/ donmuş zincir kırılması; 442
Sporlandırma besiyeri; 80
Sporlanma; 19
Sporlu bakteriler; 536
Staphylococcus aureus; 375, 528, 577
Stenothermal; 51
Sterikon; 146, 549
Sterilizasyon kontrolü; 146
Sterilizasyon; 131

Sterilize edilmeyen çözeltiler; 147
Stimülatörler; 92
Stok takibi; 210
Su aktivitesi; 46
Su mikrobiyolojisi; 421
Su; 81, 157
Substrat derişimi; 35
Substrat formülasyonu; 124
Suş; 168
Sülfit indirgeyen anaeroplar; 523, 571
Sünme hastalığı; 399
Swedberg ünitesi; 7
Tampon maddeler; 87
Tanımlama; 171, 232
Tayin limiti; 467
Tehlike; 431
Tekrarlanabilirlik; 474, 491
Termofil; 50
Termolabil; 51
Termostabil; 50
Termotolerant; 50
Ticari sterilizasyon, 122
Tindalizasyon; 141
Tipik laboratuvar hataları; 213
Titre belirleme; 237
Toplam (total) jerm; 323, 425
Toplam aerobik mezofilik bakteri; 323, 503, 550
Toplam ısı girişi; 136
Total plate count (TPC); 323
Total viable count (TVC); 323
Total viable organisms (TVO); 323
Trikotesenler; 419
Tuz; 87
UV ışınları; 67, 144
Ürün oluşumunun kinetiği; 38
Validasyon; 446
Var/yok testleri; 225
VBNC; 259
Verifikasyon; 446
Verim katsayısı; 37
Vero; 333
Vibrio parahaemolyticus; 385, 531, 581
Yabani maya; 80, 509
Yararlı mikroorganizmalar; 311
Yatık agar; 78
Yayma plak yöntemi; 260
Yersinia enterocolitica; 394, 534, 588
Yıkama; 201
Yöntem ve seyrelti seçimi; 265
Yüksek basınç; 70
Yüzeylerde mikrobiyolojik analiz; 236, 589
z değeri; 147
Zenginleştirme; 226

Ek A. ANALİZ YÖNTEM ÖRNEKLERİ

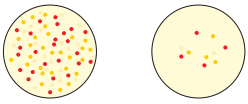
A01 Toplam Mezofil Aerop Bakteri Sayımı
A02 Koliform Bakterilerin Sayılması; Katı Besiyeri
A03 Koliform Bakterilerin Sayılması; EMS Yöntemi
A04 Koliform Bakterilerin Sayılması; Membran Filtrasyon
A05 100 mL Suda Koliform Bakteriler ve *E. coli* Aranması
A06 *E. coli* Sayılması; Katı Besiyeri
A07 *E. coli* Sayılması; Hızlı EMS Yöntemi
A08 Singlepath E. coli O157 Test Kiti Uygulaması
A09 *Salmonella* Aranması
A10 Singlepath *Salmonella* Test Kiti Uygulaması
A11 *Listeria* Aranması
A12 Singlepath *Listeria* Test Kiti Uygulaması
A13 Singlepath *Campylobacter* Test Kiti Uygulaması

Ek A01 Toplam Mezofil Aerop Bakteri Sayımı



10 g(mL) gıda, 90 mL MRD (örneğin Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Gerekli seyreltmeler yapılır. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir. PCA (örneğin Merck 1.05463) besiyerine ekim yapılır.

Petri kutuları amaca göre 28 °C ya da 37 °C'ta 48 saat inkübasyona bırakılır.

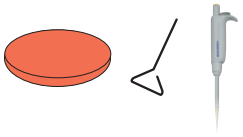


İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılır, gıdadaki toplam mezofil aerop bakteri sayısı hesaplanır.

Petri kutuları otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

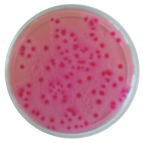
Ek A02 Koliform Bakterilerin Sayılması; Katı Besiyeri (ISO 4832)

10 g(mL) gıda, 90 mL MRD (örneğin Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.



VRB agar (örneğin Merck 1.01406) besiyerine ekim yapılıp, ikinci kat VRB ilave edilir.

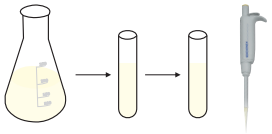
Petri kutuları 30-32 °C ya da 35-37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılır.



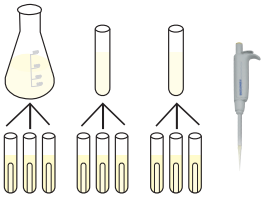
1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili koyu kırmızı koloniler sayılır.

Sterilizasyondan sonra Petri kutuları yıkanır/atılır.

Ek A03 Koliform Bakterilerin Sayılması; EMS Yöntemi (ISO 7725)

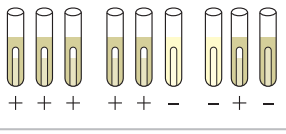


10 g(mL), gıda 90 mL MRD (örneğin Merck 1.12535) ile homojenize edilir. 10^{-2} ve katı gıdalarda 10^{-3} seyreltiler hazırlanır.



İçlerinde Durham tüpü bulunan LST broth (örneğin Merck 1.10266) besiyerinden; katı gıdalarda 10^{-1}; 10^{-2} ve 10^{-3}, sıvı gıdalardan 10^{0} ; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden olmak üzere 3'er tüpe 1'er mL ekim yapılır.

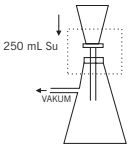
Tüpler 35-37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılır.



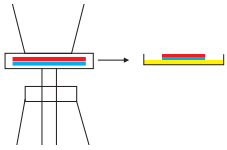
Bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirilir. EMS tablosu kullanılarak (bakınız çizelge 08.01) gıdadaki koliform grup bakteri sayısı hesaplanır.

Sterilizasyondan sonra tüpler yıkanır.

Ek A04 Membran Filtrasyon Yöntemiyle Sularda Koliform Bakteri Aranması

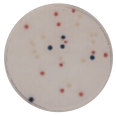


250 mL su, membran filtrasyon sisteminden geçirilir, filtre Chromogenic Coliform agar; CCA (örneğin Merck 1.10426) üzerine yerleştirilir.



Filtrenin, bakterilerin tutulmuş olduğu üst kısmı Petri kutusuna yerleştirmede yine yukarıda olmalıdır.

Petri kutusu tabanı üzerinde olacak şekilde 30-32 °C ya da 35-37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon 24 saati geçmemelidir.



CCA'da koliformlar pembe-kırmızı, *E. coli* mavi-menekşe, Laktoz negatif Enterobacteriaceae üyeleri renksiz koloni oluşturur.

Ek A05 100 mL Suda Koliform Bakteri ve E.coli Aranması

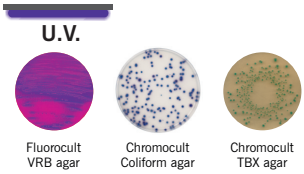
	100 mL su numunesi steril bir kaba alınır.
	Üzerine 1 poşet Readycult Coliforms (Merck 1.01298) ilave edilir.
	Çalkalanıp, 35-37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılır.
	Besiyeri renginin yeşile dönüşmesi koliform pozitif olarak değerlendirilir.
	Koliform pozitif olan örnek, loş bir yerde kısa dalga boylu UV lambası (Merck 1.13203) ile incelenir. Bunlardan floresan ışıma verenler *E. coli* olarak değerlendirilir.
	Sterilizasyondan sonra kullanılmış malzeme yıkanır.

Ek A06 E. coli Sayılması; Katı Besiyeri

10 g(mL), gıda 90 mL MRD (örneğin Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.

Fluorocult VRB agara (örneğin Merck 1.01406) ya da Chromocult Coliform agara (Merck 1.10426) ya da Chromocult TBX agara (Merck 1.16122) ekim yapılır. VRB agar ekiminde ikinci kat VRB agar ilave edilir.

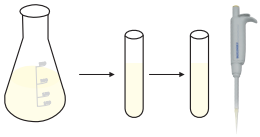
Her ikisi de 35-37 °C'ta olmak üzere Fluorocult VRB agar 18 saat ve Chromocult Coliform agar 24 saat inkübasyona bırakılır. Chromocult TBX agar ise 44 °C'da 18-24 saat inkübe edilir.



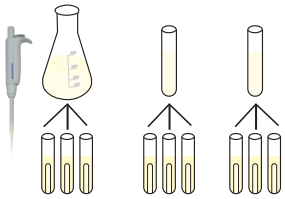
Fluorocult VRB agarda 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili koyu kırmızı ve kısa dalga boylu UV lamba (Merck 1.13203) ile loş bir yerde floresan veren koloniler, Chromocult Coliform agarda 1-2 mm çaplı mavi-menekşe koloniler, Chromocult TBX agarda mavi-yeşil koloniler sayılır ve gıdadaki *E. coli* sayısı hesaplanır.

Sterilizasyondan sonra Petri kutuları yıkanır/atılır.

Ek A07 E. coli Sayılması; Hızlı EMS Yöntemi

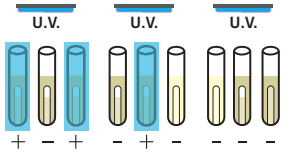


10 g(mL), gıda 90 mL MRD (örneğin Merck 1.12535) ile homojenize edilir. 10^{-2} ve katı gıdalarda 10^{-3} seyreltiler hazırlanır.



İçlerinde Durham tüpü bulunan Fluorocult LST broth (Merck 1.12588) besiyerinden; katı gıdalarda 10^{-1} ; 10^{-2} ve 10^{-3}, sıvı gıdalardan 10^{0} ; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden olmak üzere 3'er tüpe 1'er mL ekim yapılır.

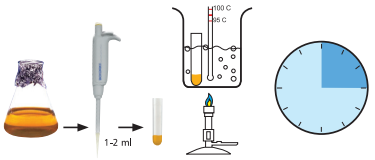
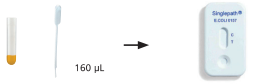
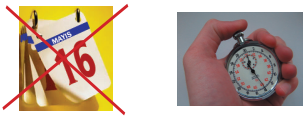
Tüpler 35-37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılır.



Bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşumu görülen koliform pozitif tüpler loş bir yerde kısa dalga boylu UV lambası (Merck 1.13203) ile incelenir. Bunlardan floresan ışıma verenler *E. coli* olarak değerlendirilir. Floresan ışımadan emin olunmazsa tüplere 1 mL 1 N NaOH eklenip tekrar incelenir. EMS tablosu kullanılarak gıdadaki *E. coli* sayısı hesaplanır.

Sterilizasyondan sonra tüpler yıkanır.

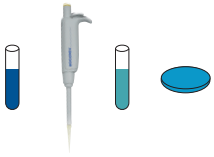
Ek A08 Singlepath® E.coli O157 Test Kiti Uygulama Şeması

	25 g(mL) gıda 225 mL selektif zenginleştirme besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	İnkübasyon: 35 - 37 °C' ta 18 - 24 saat
	Selektif zenginleştirme kültüründen 1 - 2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1 - 2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	Oda sıcaklığına getirilir.
	Singlepath E. coli O157 kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa *E. coli* O157 pozitif, olmazsa *E. coli* O157 negatif olarak değerlendirilir.
	**Toplam analiz süresi 21 saat 35 dakika**
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

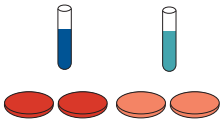
Ek A09 Salmonella Aranması (ISO 6579)

25 g(mL) gıda, 225 mL TPS (örneğin Merck 1.07228) ile homojenize edilir.

Homojenizat 35-37 ºC'ta 16-20 saat inkübasyona bırakılır.



İnkübasyondan sonra önzenginleştirme kültüründen (TPS) Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin (MKTTn) broth (Merck 1.05878) ve RVS broth (Merck 1.07700) selektif zenginleştirme besiyerlerine ekim yapılır. Bu amaçla 10 mL RVS brotha 0,1 mL TPS kültürü ve 10 mL MKTTn brotha 1 mL TPS kültürü ilave edilir. İnkübasyon, RVS brothta 42-43 °C ve MKTTn brothta 37 °C olmak üzere 24 saat süre ile yapılır. Alternatif olarak TPS kültüründen MSRV besiyerine (örneğin Merck 1.09878) damlatma yapılır ve 41,5 °C'ta 24 3 saat inkübe edilir.



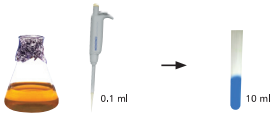
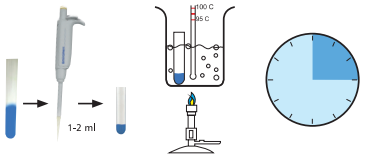
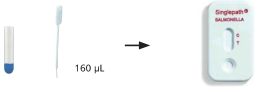
Her 2 selektif zenginleştirme kültüründen ayrı ayrı olmak üzere Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar (Merck 1.05287) ile laboratuvarın tercihine bırakılan başka bir selektif katı besiyerine sürme yapılır. Brilliant Green Fenol Red (BGFRL; Merck 1.10747) agar, Rambach agar (Merck 1.07500), ve özellikle XLT 4 agar (Merck 1.13919 ve Merck 1.08981) önerilmektedir.

Petri kutuları 37 ºC'ta 24 saat inkübasyona bırakılır.

Tipik koloniler varsa bunlardan 5 adedi ayrı ayrı olmak üzere Triple Sugar Iron (TSI) agar (Merck 1.03915), Urea broth (Merck 1.08483) ve Lysine Iron agar (Merck 1.11640) besiyerinde tanımlanır. Salmonella için tipik koloniler; XLD agarda besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli, BGFRL agarda etrafı parlak kırmızı bir zon ile çevrili, pembe kırmızı renkli, XLT4 agarda siyah renkli ve Rambach agarda kırmızı renklidir. Singlepath Salmonella da kullanılabilir.

Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

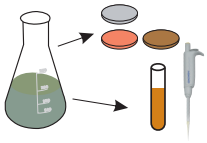
Ek A10 Singlepath® Salmonella Test Kiti Uygulama Şeması

	25 g(mL) gıda, 225 mL TPS (örneğin Merck 1.07228) besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenize edilir.
	İnkübasyon: 37 °C 'ta 18±2 saat
	TPS kültüründen 0,1 mL alınıp 10 mL RVS broth besiyerine aktarılır.
	İnkübasyon: 41,5 °C' ta 24±3 saat
	RVS kültüründen 1-2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1-2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	Oda sıcaklığına getirilir.
	Singlepath Salmonella kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir.
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa *Salmonella* pozitif, olmazsa *Salmonella* negatif olarak değerlendirilir.
	Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika.
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

Ek A11 Listeria Aranması (ISO 11290)

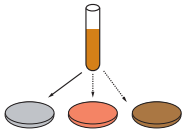
25 g(mL) gıda, 225 mL 1/2 Fraser broth (örneğin Merck 1.10398 ve örneğin Merck 1.10399) ile homojenize edilir.

Homojenizat 30 °C'ta 24 saat inkübe edilir. Gıdadaki hasar görmüş *Listeria* olduğundan endişe ediliyorsa selektif katkısı ilave edilmemiş Fraser broth besiyerinde homojenize edilip, 30 °C'ta 4 saat kendi halinde bırakılır. Daha sonra selektif katkı ilave edilip aynı sıcaklıkta 20 saat daha inkübe edilir.



Bu sürenin sonunda 10 mL tam Fraser broth besiyerine 0,1 mL inoküle edilir, paralelli olarak homojenizattan Chromocult Listeria agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI acc. ISO 11290 (Merck 1.00427, Merck 1.00432 ve Merck 1.00439) ile PALCAM agar (Merck 1.11755 ve Merck 1.12122) veya Oxford agar (Merck 1.07004 ve Merck 1.07006) besiyerlerine öze ile sürme yapılır.

Tam kuvvette Fraser broth 35-37 °C'ta 48 saat, Chromocult Listeria agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI acc. ISO 11290, PALCAM veya Oxford agar 35-37 °C'ta 24 saat inkübe edilir.

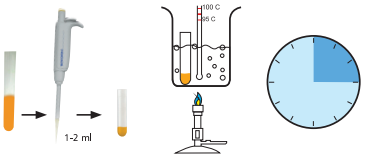
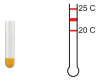
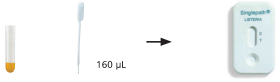


Tam kuvvette Fraser broth besiyerinden 24 ve 48 saatlerde aynı besiyerlerine sürme yapılır. 1/2 Fraser broth besiyerinden yapılmış ilk Petri kutuları değerlendirilir.

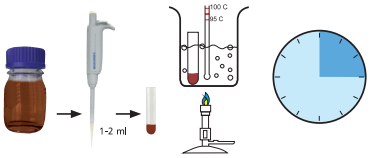
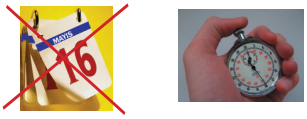
Listeria için tipik koloniler; Chromocult Listeria agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI acc.'da mavi-yeşil renkli koloni etrafı opak haleli zonlar, PALCAM agarda 1,5-2 mm çapında, zeytin yeşili gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu, Oxford agarda ise 2-3 mm çapında, siyahımsı yeşil kahverengi, siyah zonlu, çökük merkezlidir. Tipik kolonilere hemoliz, CAMP testi, ramnoz ve ksiloz testleri yapılır, Singlepath Listeria da kullanılabilir (bakınız; ek A12).

Kullanılmış tüm malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

Ek A12 Singlepath® Listeria Test Kiti Uygulama Şeması

	25 g(mL) gıda 225 mL yarı selektif zenginleştirme besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	İnkübasyon: 28-30 °C'ta 18-24 saat
	Yarı selektif zenginleştirme kültüründen 0,1 mL alınıp 9,9 mL selektif zenginleştirme besiyerine aktarılır.
	İnkübasyon: 28-30 °C'ta 18-24 saat
	Selektif zenginleştirme kültüründen 1-2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni önce uygun bir sıvı besiyerinde 28-30 °C 'da 18-24 saat inkübe edilir ve buradan alınan 1-2 mL kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	Oda sıcaklığına getirilir.
	Singlepath Listeria kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir.
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa *Listeria* pozitif, olmazsa *Listeria* negatif olarak değerlendirilir.
	Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika.
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

Ek A13 Singlepath® Campylobacter Test Kiti Uygulama Şeması

	25 g gıda 225 mL ya da 25 mL gıda 200 mL Bolton broth (Merck 1.00068 ve Merk 1.00069) besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	İnkübasyon: 37 °C ' ta 4 saat ve ilaveten 41,5 °C 'da 44 saat.
	Selektif zenginleştirme kültüründen 1-2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1-2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	Oda sıcaklığına getirilir.
	Singlepath Campylobacter kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa *Campylobacter* pozitif, olmazsa *Campylobacter* negatif olarak değerlendirilir.
	**Toplam analiz süresi 48 saat 35 dakika.**
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

Ek B DİĞER GÖRSELLER

EK B01. Sterikon biyoindikatör Sarı-turuncu renk: Yetersiz sterilizasyon. Kırmızı-menekşe renk: Yeterli sterilizasyon

EK B02. DRBC agarda *Saccharomyces cerevisia*

EK B03. Potato dextrose agarda *Saccharomyces cerevisia*

EK B04. YGC agarda *Penicillium commune*

EK B05. VRB agarda *E. coli*

EK B06. BGB brothta gaz oluşumu. Solda aşılanmamış besiyeri, ortada *Proteus vulgaris* (gelişme var, gaz yok), sağda *E. coli* (gelişme ve gaz var).

EK B07. CCA'da kırmızı renkli koloniler *Citrobacter freundii*, mavi-menekşe renkli koloniler *E. coli*

EK B08. ReadyCult Coliforms'da mavi-yeşil renk oluşumu koliform grup bakteriler için tipik reaksiyonken *E. coli* UV lamba ile floresan ışıma verir.

EK B09. Fluorocult LMX brothta *E. coli*

EK B10. Chromocult TBX agarda *E. coli*

EK B11. Fluorocult VRB agarda *E. coli*

EK B12. Tryptone Water besiyerinde indol testi. Kovacs' indol çözeltisi ile soldaki üç tüp indol pozitif sonuç vermiştir.

EK B13. Fluorocult LST brothta soldaki 3 tüp MUG pozitiftir.

EK B14. Soldaki SMAC agarda renksiz koloniler *E. coli* O157:H7 iken kırmızı koloniler *E. coli* ve *Serratia marcescens'*dir. Sağdaki SMAC agar+CT katkılı besiyerinde renksiz koloniler *E. coli* O157:H7 iken *E. coli* ve *Serratia marcescens* gelişme göstermemiştir.

EK B15. MSRV yarı katı besiyerinde hareketli *Salmonella* serotipleri

EK B16. XLD agarda *Salmonella* Enteritidis

EK B17. TSI agarda solda *E. coli*, sağda *Salmonella* (özgün fotoğraf)

EK B18. Lysine Iron agarda *Salmonella* Enteritidis

EK B19. Katkı ilaveli TSC agarda *Clostridium perfringens*, siyah kolonilerin etrafında floresan ışıma ile görülür.

EK B20. Listeria Selective Agar Base Acc. Ottaviani and Agosti'de solda *Listeria monocytogenes*, sağda *Listeria innocua*

EK B21. PALCAM agarda solda *Listeria monocytogenes*, sağda *Listeria innocua*

EK B22. Oxford agarda solda *Listeria monocytogenes*, sağda *Listeria innocua*

EK B23. Egg yolk-tellurit katkılı Baird-Parker agarda *Staphylococcus aureus*

EK B24. Giolitti-Cantoni brothta soldan sağa doğru *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*

EK B25. *Campylobacter* analizi için Bolton selective enrichment broth

EK B26. Modifiye CCDA besiyerinde *Campylobacter jejuni*

EK B27. TCBS agarda solda *Vibrio cholerae*, sağda *Vibrio parahaemolyticus*

EK B28. Chromocult CCI agarda *Cronobacter* spp.

EK B29. MYP agarda solda *Bacillus cereus*, sağda *Staphylococcus aureus*

EK B30. Chromocult Enterococci agarda solda *Enterococcus sp.*, sağda Enterokok olmayan *Aerococcus viridans*

EK B31. Slanetz and Bartley agarda *Enterococcus faecalis*

EK B32. ReadyCult Enterococci besiyerinde Enterokok dışındaki bakteriler gelişebilir (ortadaki şişe), fakat Enterokok varlığında besiyeri rengi mavi-yeşile dönüşür (soldaki şişe; *Enterococcus faecalis*).

EK B33. Pseudomonas Selective agar. Solda CN katkısı, sağda CFC katkısı kullanıldığında *Pseudomonas aeruginosa*

EK B34. King B agarda floresan ışıma veren koloniler *Pseudomonas aeruginosa* olarak doğrulanır.

EK B35. BAT agarda *Alicyclobacillus acidoterrestris*

EK B36. Bryant Burkey brothta solda gelişme var, sağda gelişme yok.

EK B37. MRS agarda *Lactobacillus casei*

EK B38. M17 agarda *Lactococcus* sp.

EK B39. Biyolojik Acil Durum Kiti içeriği

EK B40. Kimyasal Acil Durum Kiti içeriği

EK B41. Dökülen biyolojik materyale müdahale sırası

EK B42. Dökülen kimyasal maddeye müdahale sırası

Ek B43. Bakteri hücresi (sayfa 6)

Ek B44. Ökaryot hücresi (sayfa 8)

Ek B45. Havadan örnek alma cihazı (sayfa 235)

Ek B46. EZ Fluo sistemi (sayfa 305)

Ek B47. Hy-Rise sistemi (sayfa 236)

Ek B48. Hy-Lite sistemi (sayfa 237)

Ek B49. Floresan boyamanın prensibi (sayfa 306)

Ek B50. CAMP testi (sayfa 200)

Ek B51. UV lamba

Ek B52. Mikroinsinatör

Ek B53. Koagülaz testi

Ek B54. Mikrotirer plak

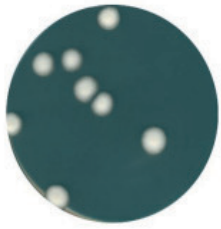
Ek B55. Çok kanallı pipet

EK B01 Sterikon biyoindikatör

EK B02 DRBC agar

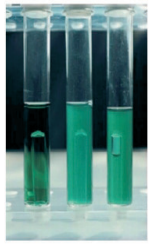
EK B03 Potato Dextrose agar

EK B04 YGC agar

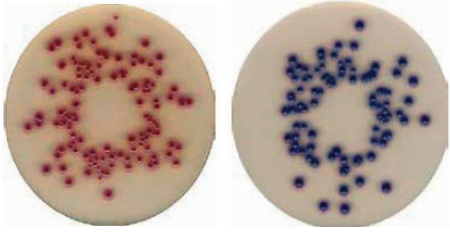


EK B05 VRB agar

EK B06 BGB broth

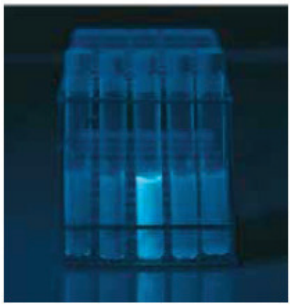


EK B07 CCA agar



EK B08 ReadyCult Coliforms

EK B09 Fluorocult LMX broth



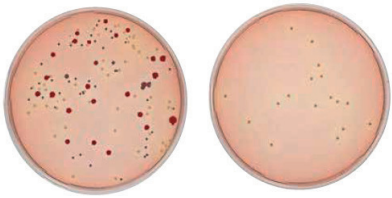
EK B10 Chromocult TBX agar

EK B11 Fluorocult VRB agar

EK B12 Tryptone water

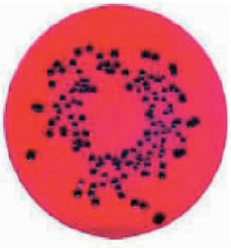
EK B13 Fluorocult LST broth

EK B14 SMAC agar

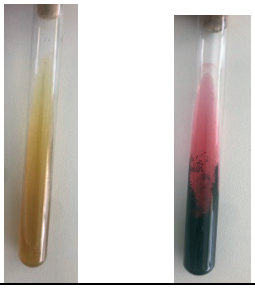


EK B15 MSRV yarı katı besiyeri

EK B16 XLD agar



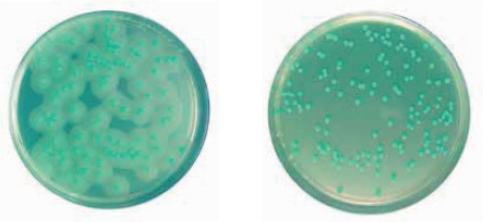
EK B17 TSI agar



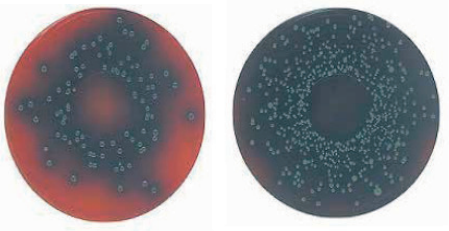
EK B18 Lysine iron agar

EK B19 TSC agar

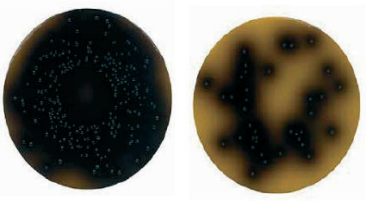
EK B20 Listeria Selective Agar Base Acc. Ottaviani and Agosti



EK B21 PALCAM agar



EK B22 Oxford agar



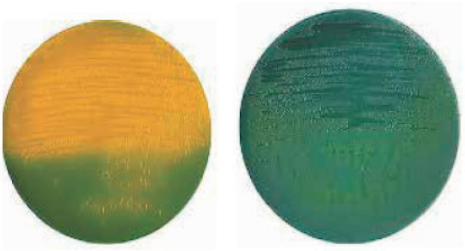
EK B23 Baird-Parker agar

EK B24 Giolitti-Cantoni broth

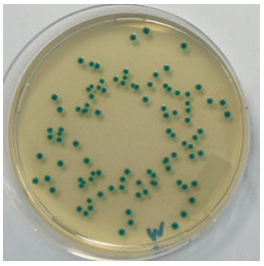
EK B25
Bolton selective enrichment broth

EK B26 Modifiye CCDA

EK B27 TCBS agar

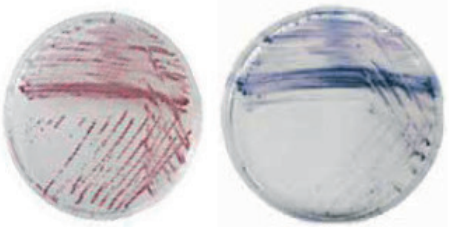


EK B28 Chromocult CCI agar



EK B29 MYP agar

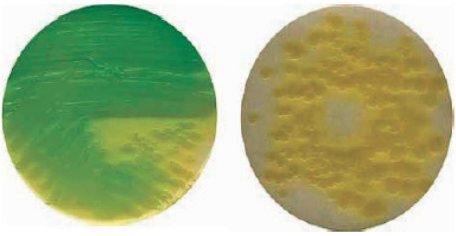
EK B30 Chromocult Enterococci agar



EK B31 Slanetz and Bartley agar

EK B32 ReadyCult Enterococci

EK B33
Pseudomonas Selective agar

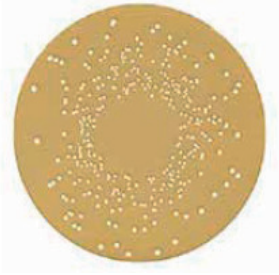


EK B34 King B agar

EK B35 BAT agar

EK B36 Bryant Burkey broth

EK B37 MRS agar



EK B38 M17 agar

EK B39 Biyolojik Acil Durum Kiti

-Kişisel Koruyucu Ekipman
-Sınırlayıcı ve Emici Malzeme
-Dezenfektanlar
-Temizlik ve Atık Ekipmanları

EK B40 Kimyasal Acil Durum Kiti

-Kişisel Koruyucu Ekipman
-Sınırlayıcı ve Emici Malzeme
-Nötralizanlar
-Temizlik ve Atık Ekipmanları

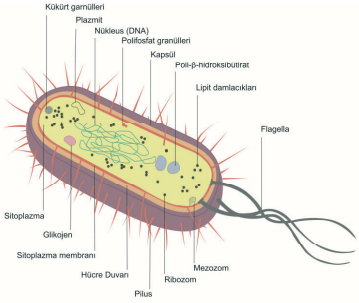
EK B41 Dökülen biyolojik materyale müdahale sırası

Biyolojik materyale maruz kalan veya yaralanan varsa kişiye yardım edin, gerekirse tıbbi yardım isteyin
-Sonra aerosol önlemlerini alın:
-Nefesinizi tutarak ortamı terk edin,
-Kapıyı kapatın ve çevredekileri uyarın,
-Müdahale etmeden önce aerosellerin yatışmasını bekleyin.
-En son olarak dekontaminasyon ve temizlik yapın.
-Dökülme/ saçılma kiti ile ortamı dekontamine edin,
-Olayı raporlandırın.

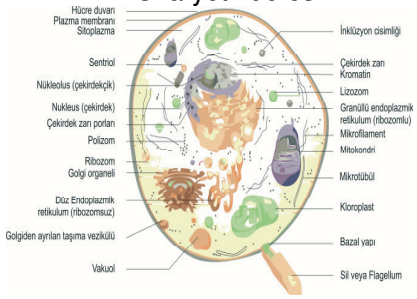
EK B42 Dökülen Kimyasal Maddeye Müdahale

-Kimyasal maddeye maruz kalan varsa veya yaralalan varsa;
-Kişiye yardım edin, gerekli ise tıbbi yardım isteyin.
-Sonra dökülen kimyasalı tanımlayın ve dökülme miktarını belirleyin;
-Yanma/ patlama riski yok ise
-Kimyasalın toksisitesi düşük ise
-Dökülen miktar <2,5 L ise
-Dekontaminasyon ve temizlik yapın;
-Dökülme-saçılma kiti ile ortamı dekontamine edip olayı raporlayın.

Ek B 43 Bakteri hücresi



Ek B 44 Ökaryot hücresi



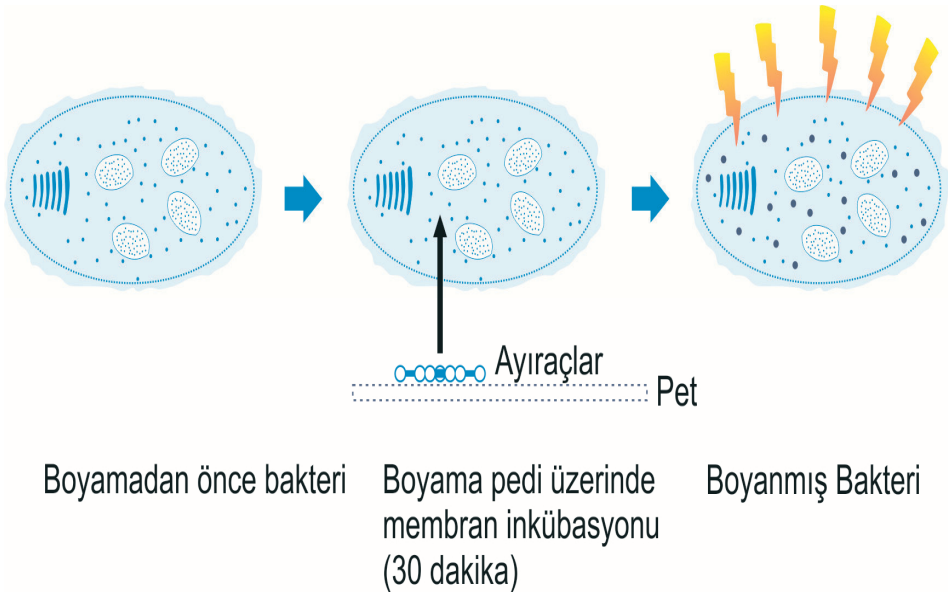
Ek B 45 Havadan örnek alma cihazı

EkB 46 Ez Fluo

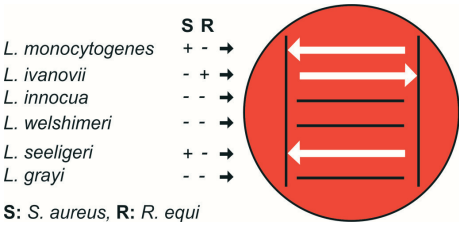
Ek B47 Hy-Rise sistemi

Ek B48 Hy-Lite sistemi

Ek B49 Floresan boyamanın prensibi



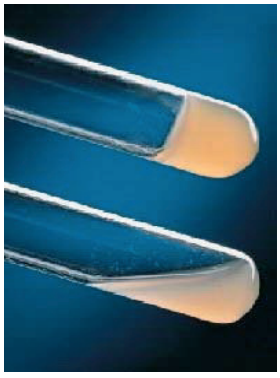
Ek B50 CAMP testi



Ek B51 UV lamba

Ek B52 Mikroinsinatör

Ek B53 Koagülaz testi



Ek B54 Mikrotirer plak

Ek B55 Çok kanallı pipet