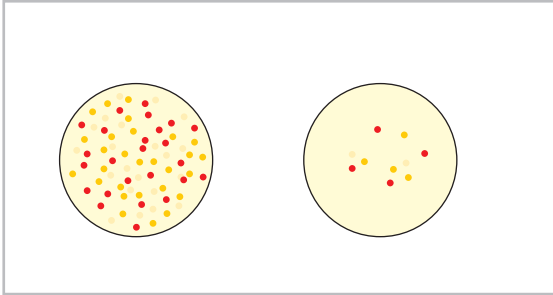


10 g (mL) gıda, 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Gerekli seyreltmeler yapılır. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir. PCA (Merck 1.05463) besiyerine ekim yapılır.



Petri kutuları amaca göre 28 °C ya da 37 °C'da 48 saat inkübasyona bırakılır.



İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılır, gıdadaki toplam mezofil aerob bakteri sayısı hesaplanır.



Petri kutuları otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

**Not:** Daha önce 30-300 arasında koloni içeren seyreltilerdeki ekimler dikkate alınır iken, artık ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının ağırlıklı aritmetik ortalaması alınarak örnekteki sayı hesaplanır. Bu hesaplamada kullanılan formül;

$N = C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$  şeklindedir. Burada;

N = Gıda örneğinin 1 gram ya da 1 mL'sinde mikroorganizma sayısı

C = Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V = Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim (mL)

$n_1$  = İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

$n_2$  = İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

d = Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır.

Toplam bakteri (jerm) sayımı -genel olarak- hijyen kontrolü amacıyla yapılır. Toplam bakteri ile "toplam mezofil aerob bakteri" kastedilir. Toplam psikrofiller, toplam termofiller ve diğer gruplarda da (anaerob) sayım aynı esas ile yapılır. Kimi kaynaklarda APS (Aerobic Plate Count) ve AKS (Aerobik Koloni Sayısı) olarak ifade edilen budur. Analiz edilen örnekte PCA besiyerinde gelişebilen mayalar varsa bunlar da sayıma dâhil edilir. Küfler genel olarak 24-48 saat inkübasyonda gelişerek koloni oluşturamazlar.

Çoğu kez Plate Count Agar olmak üzere, genel bir besiyerinde standart yayma ya da dökme yöntemiyle ekim ve inkübasyondan sonra bu besiyerinde oluşan koloniler sayılarak bakteri sayısı belirlenir. Plate Count Agar besiyeri, ISO 4833 ve FDA Form 2400a 3/01 ve daha pek çok uluslararası standarda uygun olarak toplam bakteri analizinde kullanılmaktadır.

**Not 01:** Günlük ve standart uygulamada inkübasyon sıcaklığı 28 °C ve süresi 48 saattir. Bu şekilde genel hijyen ya da işletme sanitasyonu kontrol edilir. Avrupa ülkelerinde yaygın olarak 30-32 °C kullanılır. İnkübasyon sıcaklığı ABD'nde 35-37 °C ve inkübasyon süresi 24-48 saat olarak benimsenmektedir ve bu şekilde gıdanın potansiyel tehlikesi belirlenir. Bu nedenle inkübasyon parametreleri rapora yazılmalıdır. Benzer uygulama koliform grup bakteri analizinde de vardır.

**Not 02:** Süt ürünlerinde toplam bakteri analizinde Plate Count Skim Milk Agar besiyeri kullanılması IDF (Uluslararası Sütçülük Federasyonu; International Dairy Federation) tarafından önerilmektedir.

### **Kullanılan Malzeme**

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözültisi (Merck 1.15525)  
Plate Count Agar (Merck 1.05463)  
Plate Count Skim Milk Agar (Merck 1.15338)  
Su Agar (bileşimi; %1 Agar-agar olan damıtık su)

### **Analiz**

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler) den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

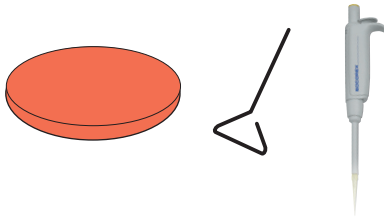
-Eğer analiz edilen örnekte Petri kutusunun yüzeyini kaplayacak şekilde yayılma yapan bakteriler olduğundan kuşkulanıyorsa ekimden sonra Plate Count Agar üzerine 45 °C'da tutulan 4-5 mL Su Agar besiyeri dökülür ve bu uygulama analiz raporunda belirtilir.

-Seçilen inkübasyon sıcaklığında 48±2 saat inkübasyon sonunda PCA besiyerinde gelişen bütün koloniler "toplam bakteri" olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir. Su analizlerinde inkübasyon 22 °C'da 72 saat ve ayrıca 37 °C'da 48 saat olarak yapılmaktadır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.



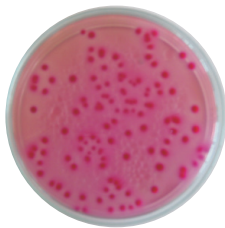
10 g (mL) gıda, 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.



VRB Agar (Merck 1.01406) besiyerine ekim yapıp, ikinci kat VRB ilave edilir.



Petri kutuları 30-32 °C ya da 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili koyu kırmızı koloniler sayılır.



Sterilizasyondan sonra Petri kutuları yıkanır/atılır.

**Not: Çoğu standartta Petri kutusunda 25-250, 30-300 gibi koloni sayıları dikkate alınmakla birlikte FDA, süt ve ürünleri için VRB Agar sayımlarında 1-154 sınırlarını esas almaktadır.**

Koliform grup bakteriler denildiğinde; 37 °C'da 48 saat içinde laktozdan asit ve gaz oluşturan, Gram negatif, sporsuz, çubuk şeklinde olan bakteriler anlaşılır. Bu tarife göre; *Enterobacteriaceae* üyeleri olan *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Ent. cloacae*, *Citrobacter freundii* ve *Klebsiella pneumoniae* koliform grup bakteriler olarak tanımlanmış olur. Fekal koliformlar, ayrı bir gruptur.

**Not 01:** Koliform grup bakterilerin analizinde inkübasyon sıcaklığı yaygın bir şekilde 35-37 °C olarak kullanılmakla beraber, bazı uluslararası kuruluşlar tarafından 30-32 °C inkübasyon sıcaklığı önerilmektedir. Bunlardan 30-32 °C genel olarak proses kontrolü, 35-37 °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 02:** Koliform bakterilerin laktozdan asit oluşturması sonucunda VRB Agar bileşimindeki pH indikatörü, kolonilerin koyu kırmızı renk oluşturmasına neden olur. 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) Broth'a ekilerek, burada 30-32 °C'da 24 saat içinde gaz oluşumu kontrol edilmelidir. Bu kontrol, yöntemin doğruluğunu onaylamak için 3'er ay aralıklarla tipik kolonilere de uygulanmalıdır.

Koliform grup bakterilerin katı besiyerinde sayımı için pek çok agarlı besiyeri bulunmakla birlikte, günlük uygulamada yaygın olarak VRB Agar (ISO 4832, FDA Form 2400a; 3/01), Chromocult Coliform Agar ve Chromocult Coliform Agar ES besiyerleri kullanılmaktadır.

### **Kullanılan Malzeme**

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)  
VRB Agar (Merck 1.01406)  
Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454)  
Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)  
Chromocult Coliform Agar, Enhanced Selectivity ES (Merck 1.00850)

### **Analiz**

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/ veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

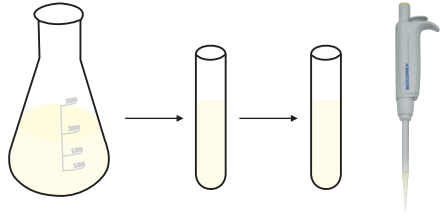
-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyrelti(ler) den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-Dökme yönteminde tam jelleşmeden sonra, yayma yönteminde ise besiyerinin sıvıyı emmesinden sonra 45-50 °C'da tutulan 4-5 mL kadar erimiş VRB Agar besiyeri ikinci kat olarak dökülür. İkinci katın da tam olarak jelleşmesinden sonra Petri kutuları kapakları üzerine çevrilerek, inkübatöre yerleştirilir. İnkübasyon sıcaklığı, ilgili talimatta ve analiz raporunda belirtilmelidir.

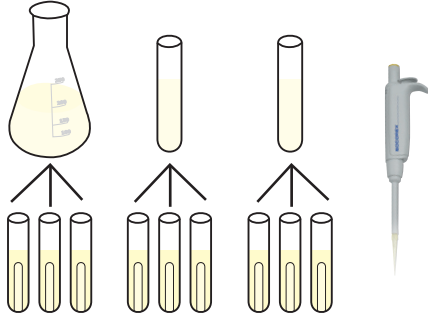
-Seçilen inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat inkübasyon sonunda VRB Agar'da 1-2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak sayılır. VRB Agar'da atipik koloni gelişimi olursa bunlar BGB Broth besiyerine aşılanır ve 30-32 °C'da 24 saat sonra gaz oluşumu izlenir.

-Koliform grup sayısı standart şekilde hesaplanır ve kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.



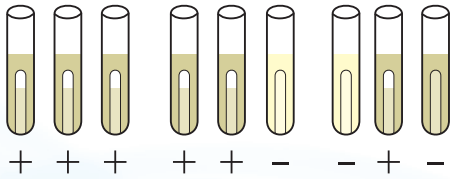
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir.  $10^{-2}$  ve katı gıdalarda  $10^{-3}$  seyreltiler hazırlanır.



İçlerinde Durham tüpü bulunan LST Broth (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  $35-37^{\circ}\text{C}$ 'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



LST Broth besiyerinde bulanıklık ve gaz oluşumu görülen tüpler koliform grup pozitif olarak değerlendirilir. Bunlardan EC Broth besiyerine ekim yapılır.  $45\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'da 24 saat inkübasyon sonrasında bulanıklık ve gaz oluşumu görülen tüpler fekal koliform olarak işaretlenir. Fekal koliform pozitif olan tüplerden Tryptone Water besiyerine ekim yapılır.  $45\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'da 24 saat inkübasyon sonrasında bulanıklık görülen tüplere indol testi uygulanır. İndol pozitif olanlar *E. coli* olarak değerlendirilir.



Sterilizasyondan sonra tüpler yıkanır.

Analiz, önce koliform grup bakteriler için selektif olan Lauryl Sulfate (LST) Broth besiyerinde inkübasyon ile başlar. Pozitif sonuç veren tüpler koliform grup bakteri olarak değerlendirilir. Pozitif tüpler, EC Broth'a ekilir ve inkübasyon sonunda pozitif sonuç verenler fekal koliform grup bakteriler olarak değerlendirilir, bunlardan Tryptone Water besiyerine ekim yapılır. İnkübasyon sonunda indol testi uygulanır, indol pozitif olanlar *E. coli* olarak değerlendirilir.

**Not 01:** EMS yönteminde kullanılacak besiyerlerinde otoklav sonrası Durham tüpünde hava kabarcığı kalmamış olmalıdır. Hava kabarcığı varsa, otoklavın yanlış kullanılması/ doldurulması sonucunda besiyeri yeterince steril olmamıştır.

**Not 02:** EMS Yöntemi ile çalışılırken ekim sonrası kuvvetli karıştırmaya bağlı olarak Durham tüpüne hava girmemelidir.

### Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)  
LST Broth (Merck 1.10266)  
Brilliant Green Bile (BGB) Broth (Merck 1.05454)  
EC Broth (Merck 1.10765)  
Tryptone Water (TW) (Merck 1.10859)  
Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293)

### Analiz

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak LST Broth tüplerine ekim yapılır. Gerekliyse LST Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır.

-Seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 24±2 saat inkübe edilir. Bazı standartlarda üreme (gaz) görülmemesi halinde ilave 24±2 saat daha inkübasyon önerilmektedir.

-İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve gaz görülen tüpler, "koliform grup pozitif" olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanılarak koliform grup sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Bazı standartlarda LST pozitif tüplerden, BGB Broth'a inokülasyon ve burada da 30 °C'da 24 saat sonunda gaz oluşumunun incelenmesi önerilir.

-Pozitif sonuç alınan tüplerden, içinde Durham tüpü bulunan EC Broth besiyerlerine ekim yapılır. İnkübasyon 45±0,5 °C'da 24 saat sürer ve mikroprosesör kontrollü su banyosu kullanılması gerekir. Bu süre sonunda Durham tüpünde gaz görülen tüpler pozitif olarak işaretlenir ve EMS çizelgesinden yararlanılarak fekal koliform grup bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir. Bazı standartlarda gaz görülmeyen tüplerin 24 saat daha inkübe edilmesi önerilmektedir.

-EC Broth pozitif olan tüplerden Tryptone Water besiyerlerine ekim yapılır. İnkübasyon 45±0,5 °C'da 24 saat sürer ve mikroprosesör kontrollü su banyosu kullanılması gerekir. Bu süre sonunda bulanıklık görülen tüplere birkaç damla Kovacs' indol çözeltisi eklenir ve tüp yavaşça elle karıştırılır. En geç 1 dakika içinde (çoğu defa 5-10 saniye içinde) tüpün üstünde vişne çürüğü renkli halka oluşması indol testinde pozitif sonuçtur. EMS çizelgesinden yararlanılarak *E. coli* sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.



100 mL su örneği steril bir kaba alınır.



Üzerine 1 poşet ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298) ilave edilir.



Çalkalanıp, 35-37 °C'da 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 ışığa verenler *E. coli* olarak değerlendirilir.



Sterilizasyondan sonra kullanılmış malzeme yıkanır.

Günlük uygulamada içme, kullanma ya da işletme suyu gibi koliform grup bakteri "olmaması" gereken örnekler için kullanılır.

**Not:** ReadyCult Coliforms; 50 ve 100 mL suda analiz yapılmak üzere 2 ayrı ambalajda pazarlanmaktadır. Burada yaygın olarak kullanılan 100 mL su için olan anlatılmaktadır. 50 mL için olan tercih edilirse burada verilen tüm bilgiler 50 mL için değerlendirilmelidir.

## Kullanılan Malzeme

ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298)  
UV EI Lambası (Merck 1.13203)

## Analiz

-Su örneği mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir, steril uygun bir kaba (erlen, şişe vb.) 100 mL olarak aktarılır.

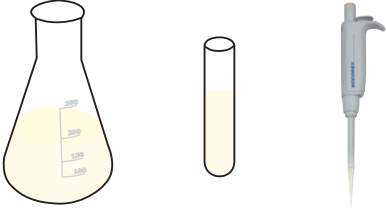
-Önceden ışınlanarak sterilize edilmiş besiyerinin ambalajı aseptik koşullara uyularak açılır, dehidre besiyerinin tümü su örneğine aktarılır, tüm partiküller eriyinceye kadar elle ve yavaşça karıştırılır. Besiyeri oda sıcaklığındaki suda kolayca erir.

-İnkübasyon sonrasında (37 °C'da 24±2 saat) besiyeri renginin mavi-yeşile dönüşmesi, analiz edilen suda koliform bakteri varlığını gösterir ve "100 mL suda koliform bakteri var" şeklinde sonuç verilir. Besiyeri rengi değişmezse "100 mL suda koliform grup bakteri olmadığı" anlaşılır. İnkübasyon sonunda orijinal sarı renk korunuyor -ancak bulanıklık varsa - koliform grup bakteriler dışında bakteriyel gelişmeye karar verilir ve analiz sonucu yine "100 mL suda koliform grup bakteri yok" şeklinde düzenlenir.

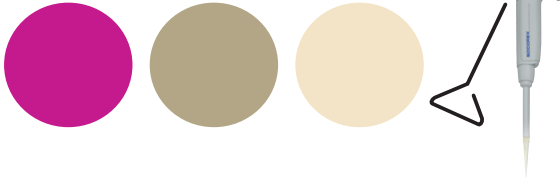
-Koliform pozitif çıkan örnekte *E. coli* analizi yapılabilir. Bu amaçla pozitif sonuç veren kap loş bir yerde UV lamba ile kontrol edilir. Floresan ışımaya *E. coli* varlığını gösterir. Kabın önceden kendiliğinden floresan verip vermediği kontrol edilmelidir. Bazı erlenler kendiliğinden floresan ışımaya verir. Bunlar, MUG reaksiyonuna dayalı *E. coli* analizinde kullanılmaz.

-UV lamba ile floresan ışımaya olup olmadığı kesin belirgin değilse, 100 mL su için 10 mL 1 N NaOH eklenip karıştırılır ve tekrar kontrol edilir. Bazı bakterilerin oluşturduğu aşırı asitlik floresan ışımaya maskeleyebilmektedir. NaOH ilavesi bu asitliği nötralize etmek için kullanılır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.



10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.



Fluorocult VRB Agar'a (Merck 1.01406) ya da Chromocult Coliform Agar'a (Merck 1.10426) ya da Chromocult TBX Agar'a (Merck 1.16122) ekim yapılır. VRB Agar ekiminde ikinci kat VRB Agar ilave edilir.



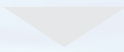
Her ikisi de 35-37 °C'da olmak üzere Fluorocult VRB Agar 18 saat ve Chromocult Coliform Agar 24 saat inkübasyona bırakılır. Chromocult TBX Agar ise 44 °C'da 18-24 saat inkübe edilir.



**U.V.**



Fluorocult VRB Agar'da 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 Agar'da 1-2 mm çaplı mavi-menekşe koloniler, Chromocult TBX Agar'da mavi-yeşil koloniler sayılır ve gıdadaki *E. coli* sayısı hesaplanır.



Sterilizasyondan sonra Petri kutuları yıkanır/atılır.

Koliform grup bakterilerin analizinde olduğu gibi *E. coli* sayımında da pek çok besiyeri olmakla birlikte, VRB Agar+MUG, Chromocult Coliform Agar ve Chromocult Coliform Agar ES besiyerleri, günlük gıda analizlerinde yaygın olarak kullanılan besiyerleridir. Chromocult TBX Agar ise ISO 16649'a göre gıda ve yemlerde *E. coli* sayımı için önerilmektedir.

**Kullanılan Malzeme**

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözültisi (Merck 1.15525)  
VRB Agar+MUG (Merck 1.04030)  
Bactident *E. coli* (Merck 1.13303)  
UV El Lambası (Merck 1.13203)  
Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)  
Chromocult Coliform Agar ES (Merck 1.00850)  
Chromocult TBX Agar (Merck 1.16122)

**Analiz**

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/ veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/ veya uygun seyrelti(ler) den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

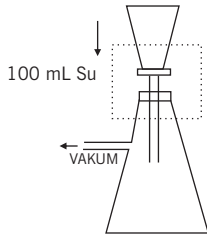
-VRB+MUG Agar besiyerinde 37 °C'da 18 saat inkübasyon sonunda 1-2 mm çaplı koyu kırmızı renkli kolonilerin tümü toplam koliform grup olarak değerlendirilir. Bunlardan, UV el lambası ile floresan ışığa verenler *E. coli* olarak işaretlenir. VRB+MUG Agar besiyerinin 18 saatten uzun süre inkübasyon yapılması halinde floresan ışığa yayılmakta ve tüm Petri kutusunu kaplayarak pozitif ve negatif kolonilerin ayırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle VRB+MUG Agar besiyeri 18 saat süre ile inkübe edilir.

-Chromocult Coliform Agar ve Chromocult Coliform Agar ES besiyerinde 37 °C'da 24±2 saat inkübasyon sonunda 1-2 mm çaplı koyu mavi-menekşe renkli koloniler *E. coli* olarak sayılır. Diğer koliformlar, kırmızı-somon renkli koloniler oluştururlar.

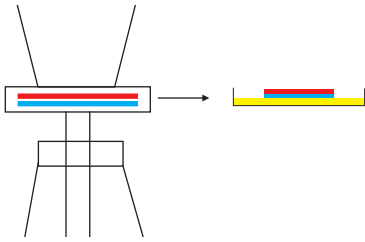
-Chromocult TBX Agar besiyerinde ISO 16649 dökme yöntemi ile çalışılmasını önermektedir. Analiz yapılan örnekte dondurma, kurutma, ısıtma, kimyasal madde uygulaması vb. gibi nedenlerle hasar görmüş bakteriler olduğundan kuşku duyuluyorsa inkübasyon önce 30-37 °C'da 4 saat, arkasından 44±1 °C'da 18-20 saat, aksi halde doğrudan 44±1 °C'da 18-24 saat yapılır. İnkübasyon sonunda mavi-yeşil renkli tüm koloniler *E. coli* olarak sayılır. Yüksek inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak bu besiyerinde diğer koliform bakterilerin sayımı yapılamaz.

-*E. coli* (ve gerekli ise koliform grup bakterisi) sayısı standart şekilde hesaplanır ve sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.



100 mL su, membran filtrasyon sisteminden geçirilir, filtre Lactose TTC Agar with Tergitol 7 (Merck 1.07680) üzerine yerleştirilir.



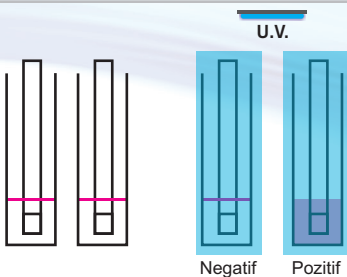
Filtrenin, bakterilerin tutulmuş olduğu üst kısmı, Petri kutusuna yerleştirmede yine yukarıda olmalıdır.



Petri kutusu tabanı üzerinde olacak şekilde 30-32 °C ya da 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Sarı-portakal renkli koloniler koliform grup bakterisi olarak değerlendirilir ve su örneğindeki koliform grup bakterisi sayısı hesaplanır.



Tipik koliform kolonilerinin *E. coli* olup olmadığı Bactident *E. coli* kiti ile belirlenebilir.

Su, berrak meyve suları vb. gıdalarda düşük sayıdaki koliform grup bakterilerin analizi, membran filtrasyon yöntemi ile yapılır.

Su ve gıdaların membran filtrasyonla koliform bakteri analizinde sıklıkla VRB Agar, Chromocult Coliform Agar ya da Chromocult Coliform Agar ES kullanılır. "Lactose TTC Agar with Tergitol 7" besiyeri, ISO 9308'e göre suların membran filtrasyon yöntemi ile analizinde kullanılmaktadır.

**Not:** Membran filtrasyon uygulamasında seçilen inkübasyon sıcaklığı ne olursa olsun, Petri kutusu inkübatöre tabanı üzerine yerleştirilir. Inkübasyon süresince filtre üzerine su damlası düşmemesi için agar yüzeyi yeteri kadar kuru olmalıdır.

## Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözeltilisi (Merck 1.15525)  
VRB Agar (Merck 1.01406)  
Lactose TTC Agar with Tergitol 7 (Merck 1.07680)  
Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)  
Chromocult Coliform Agar ES (Merck 1.00850)  
Bactident *E. coli* (Merck 1.13303)  
UV El Lambası (Merck 1.13203)

## Analiz

-Gıda ya da su örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon gerekli ise Maximum Recovery Diluent kullanılır. Yağsız süt ürünleri -ön filtrasyon koşuluyla- ¼ Ringer çözeltisi ile homojenize edilir.

-Örnek, membran filtrasyondan geçirilir ve filtre Petri kutusunda hazırlanmış besiyeri üzerine yerleştirilir. Bu amaçla standart 9 cm ya da filtreye uygun olmak üzere 6 cm çaplı Petri kutuları kullanılır. Filtre, besiyeri üzerine yerleştirilirken bakterilerin tutulmuş olduğu yüzeyin, üste gelecek şekilde olmasına dikkat edilir.

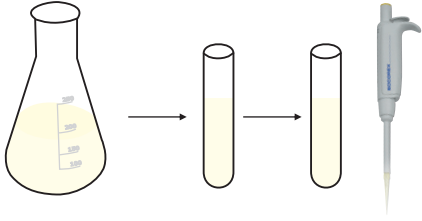
-Petri kutusu -kapağı üste gelecek şekilde (tabanı üzerine)- seçilmiş inkübasyon sıcaklığında 18-24 saat inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sıcaklığı, ilgili talimatta ve analiz raporunda belirtilmelidir.

-VRB Agar besiyerinde 1-2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak sayılır. *E. coli* dışındaki koliformlar; Chromocult Coliform Agar ve Chromocult Coliform Agar ES besiyerinde 1-2 mm çaplı somon-kırmızı renkli koloni oluştururlar. Bu uygulamada, her iki besiyerinde de koyu mavi-menekşe renkli *E. coli* kolonilerinin sayısının da koliform grup bakteri sayısına eklenmesi gerekir. *E. coli* varlığı saptanırsa ayrı olarak rapora geçilir.

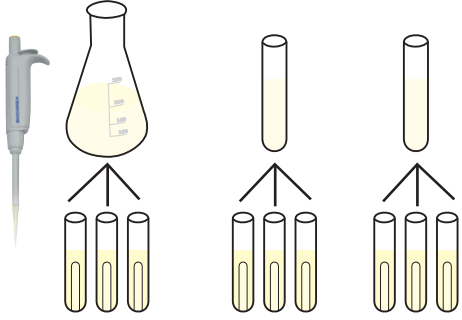
-Lactose TTC Agar with Tergitol 7 besiyerinde sarı-portakal renkli koloniler koliform grup bakteri olarak değerlendirilir. Bu besiyerinde koliform grup ve *E. coli*, koloni morfolojisi ile ayrılamaz. Kolonilerin *E. coli* olup olmadığının anlaşılması Bactident *E. coli* ile yapılabilir. Bu amaçla 0,2 mL damıtık su, kitin özel küvetine aktarılır ve öze ile alınan koloni bu suyun içinde çözülüp 37 °C'da inkübasyona bırakılır. 2 saat sonra UV el lambası ile kontrol edilir, floresan ışığa, *E. coli* olarak değerlendirilir.

-Sayım ya da var/yok analiz sonuçları standart şekilde verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.



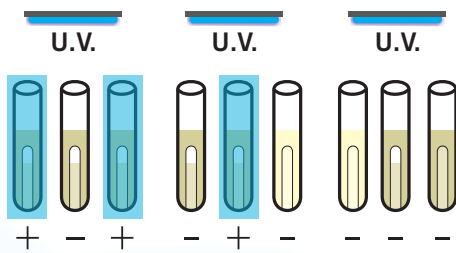
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir.  $10^{-2}$  ve katı gıdalarda  $10^{-3}$  seyreltiler hazırlanır.



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  $35-37^{\circ}\text{C}$ 'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşumu görülen koliform grup pozitif tüpler loş bir yerde kısa dalga boylu UV lambası (Merck 1.13203) ile incelenir. Bunlardan floresan ışımaya 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.

**Not: Kendiliğinden floresan veren tüpler bu analizde kullanılmaz**

Bu yöntemde koliform grup bakteriler ve *E. coli* beraberce sayılır. Bir diğer deyiş ile ekimi yapılan tüpler önce standart yöntemle koliform bakteri açısından değerlendirilir, koliform grup pozitif olanlar UV el lambası ile *E. coli* açısından kontrol edilir. Fluorocult LST (MUG) Broth'ta MUG, besiyeri bileşimine katılmıştır, ayrıca katkı ilavesi söz konusu değildir.

### Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)  
Fluorocult LST (MUG) Broth (Merck 1.12588)  
UV El Lambası (Merck 1.13203)  
Kovacs' İndol Çözeltisi (Merck 1.09293)  
1 N NaOH (Merck 1.06462)

### Analiz

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/ veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak Fluorocult LST Broth tüplerine ekim yapılır. Gerekiyorsa Fluorocult LST Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır.

-İnkübasyon, 37 °C'da 24±2 saat süre ile yapılır. Bazı standartlarda üreme (gaz) görülmemesi halinde ilave 24±2 saat daha inkübasyon önerilmektedir. Günlük kontrolde 24 saat inkübasyon yeterlidir.

-İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve gaz görülen tüpler, "koliform grup pozitif" olarak işaretlenir. EMS çizelgesinden yararlanılarak koliform grup bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (mL) olarak verilir.

-Koliform grup pozitif olan tüpler UV el lambası ile tercihen loş bir yerde kontrol edilir. Bunlardan floresan ışığa verenler *E. coli* pozitif olarak işaretlenir. EMS çizelgesinden yararlanılarak *E. coli* sayısı hesaplanıp, sonuç EMS/g (mL) olarak verilir. Koliform negatif sonuç veren (Durham tüpünde gaz görülmeyen) tüpler UV lamba ile kontrol edilmez.

-MUG reaksiyonunda sahte pozitif sonuçlardan kaçınmak için indol testi uygulanabilir. Floresan ışığa görülen tüplere 1 mL Kovacs' indol çözeltisi damlatılır, elle yavaşça karıştırılır, en geç 1 dakika (genellikle 5-10 saniye) içinde besiyeri yüzeyinde vişne çürüğü renkli halka toplanması indol testinin pozitif olduğunu gösterir. *E. coli*, MUG ve indol pozitif tek bakteridir. MUG negatif tüplere indol testi uygulanmaz. Fluorocult LST Broth'ta indol testi yapılabilir, ilave bir aşılılamaya gerek yoktur. Günlük gıda kontrolünde pozitif MUG sonuçlarının indol testi ile doğrulanması gerekli değildir. Bu test daha çok araştırma esaslı çalışmalarda uygulanır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır. İndol testi uygulanmış tüpler otoklavlanmaz, bunlar bir gece boyunca kendi halinde bırakılarak kendiliğinden (oto) sterilizasyon sağlanır.

**Not 01:** Tüp içinde aşırı asit gelişimi floresan ışığı maskelenebilir ve sonuç kesin olarak belirlenemeyebilir. Bu durumda tüpe 1 mL 1 N NaOH (4 g/100 mL) ilavesi, karıştırılması ve tekrar floresan kontrolü gerekir. NaOH ilavesi, daha sonra yapılacak indol testini etkilemez.

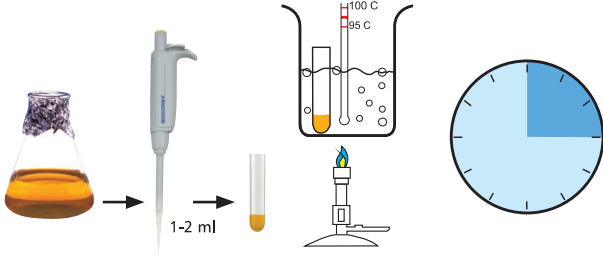
**Not 02:** Bazı tüpler kendiliğinden floresan verir. Önceden tüplerin kontrol edilmesi, kendiliğinden floresan veren tüplerin bu testte kullanılmaması gerekir.



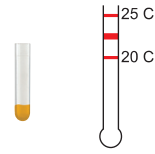
25 g (mL) gıda 225 mL selektif zenginleştirme besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.



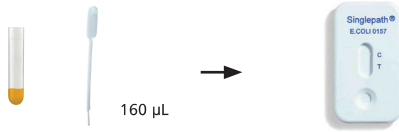
İnkübasyon: 35–37°C'da 18–24 saat



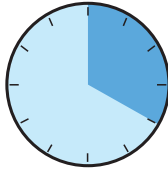
Selektif zenginleştirme kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.



Oda sıcaklığına getirilir.



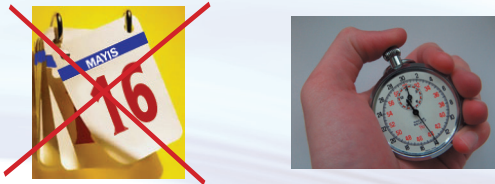
Singlepath E. coli O157 kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.



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.

Singlepath *E. coli* O157 test kiti kullanarak -katı besiyerinde izolasyon aşamasına gerek kalmadan- 24 saatten kısa bir süre içinde ve "hızlı analiz yaklaşımı ile" gıdada *E. coli* O157 serotiplerinin varlığının araştırılması çoğu laboratuvarında günlük analiz içinde yer almaktadır.

**Not 01:** mEC Broth besiyerinin et ürünlerinde, mTS Broth besiyerinin süt ürünlerinde kullanılması önerilmektedir.

**Not 02:** Singlepath *E. coli* O157 Test Kiti, O157 serotiplerine özgüdür. Dolayısı ile pozitif sonuç alınırsa standart kültürel yöntemlerle analize devam edilip, gıdada *E. coli* O157:H7 serotipinin varlığı araştırılır. Negatif sonuçta ise "O157 serotipi olmadığı için O157:H7 serotipi de yoktur" yaklaşımı ile analize son verilir.

**Not 03:** Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

### Kullanılan Malzeme

m TS Broth (Merck 1.09205)  
m EC Broth (Merck 1.14582)  
Singlepath *E. coli* O157 Test Kiti (Merck 1.04141)

### Analiz

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve doğrudan modifiye Tryptic Soy (mTS) Broth ya da modifiye EC (mEC) Broth besiyerinde homojenize edilir. Sıvı gıda bu besiyerlerine eklenir ve 37 °C'da 24 saat inkübe edilir. Her iki besiyeri de novobiosin içermekte olup, otoklav sonrası ayrıca novobiosin ilavesine gerek yoktur. Bu özellik, sadece granül yapısında olan besiyerlerinde vardır.

-Bu süre sonunda besiyerinden cam bir tüpe 1-2 mL kadar alınıp kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına soğutulur.

-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. Bu, çizgi kitin doğru çalıştığını kanıtlar. "T" (test) penceresinde kırmızı şerit meydana gelmiş olması test edilen kültürde -dolayısıyla test edilen gıdada- *E. coli* O157 serotipi olduğunu gösterir. Analize standart kültürel yöntemlerle devam edilir.

-Test kiti, 20 dakikadan sonra değerlendirmeye alınmaz.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar ve Singlepath *E. coli* O157 test sonucu negatif olan kitler de dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan ve kullanılmış tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.

## Verotoksin Belirlenmesi

A09

	25 g gıda 225 mL mTSB ya da mEC Broth besiyerine ilave edilir. Süt ürünleri için mTSB Broth, et ürünleri için mEC Broth kullanılmalıdır. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	mEC Broth 42°C 'da, mTSB Broth 35–37 °C'da 18–24 saat inkübe edilir.
	Selektif zenginleştirme kültüründen CT–SMAC Agar besiyerine tek koloniler düşecek şekilde sürme ya da yayma yapılır.
	CT–SMAC Agar 35–37 °C'da 18–24 saat inkübe edilir.
	CT–SMAC Agar besiyerinden tipik birkaç koloni 1 mL Caye Broth + Carbadox besiyerine inoküle edilir.
	37 °C'da 6 saat inkübe edilir.
	Bu kültürden Eppendorf tüpüne 180 µL alınır, üzerine 20 µL polimiksin çözeltisi ilave edilir.
	35–37 °C 'da 10 dakika inkübe edilir.
	Duopath Verotoksins 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. (VT1) ve/veya (VT2) şeridi kırmızı olursa bu verotoksin(ler) açısından pozitif, olmazsa negatif olarak değerlendirilir.
	<b>Toplam analiz süresi 48 saat 35 dakika.</b>
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

*E. coli* O157 ya da diğer patojenik *E. coli* serotipleri içinde EHEC olarak gruplandırılanlar en tehlikeli olanlardır. Bunlar, VT1 ve VT2 olarak adlandırılan 2 verotoksinde biri ya da her ikisini de üretirler. Serotipin ne olduğunun (rneğin H7 olup olmadığının) belirlenmesi yerine, doğrudan verotoksin oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi halk sağlığı açısından çok daha önemlidir.

Amaç, standart Şekilde izole edilmiş tipik koloninin VT1 ve/veya VT2 oluşturup oluşturmadığının belirlenmesidir. Standart Şekilde analiz ile elde edilmiş tipik *E. coli* O157 kolonilerine uygulanır. Sadece bir koloni için uygulanabileceği gibi, tipik 4-5 koloni bir arada da incelenebilir. Bu koşulda analiz daha ekonomik Şekilde yapılmış olur. Aynı gıda örneğinden gelen 4-5 koloni beraberce analiz yapıldığında sonuç pozitif çıkarırsa, analiz edilen gıdada verotoksin pozitif EHEC suşu ya da suşları bulunduğuna karar verilir. Tipik bir koloninin VT1 ve/ veya VT2 oluşturup oluşturmadığı 7 saatten biraz daha kısa bir süre içinde belirlenir.

### Kullanılan Malzeme

CAYE Broth Base (Merck 1.00060)  
CAYE Supplement (Carbadox; Merck 1.00051)  
Duopath Verotoxins (Merck 1.04144)  
Polymyxin B Sulfate (Merck 1.09875)

### Analiz

-Standart yöntemle CT-SMAC Agar besiyerinden elde edilen tipik morfolojiye sahip bir ya da birkaç koloni, 1 mL CAYE Broth+CAYE Supplement besiyerinde homojenize edilir ve 37 C'da 6 saat inkübasyona bırakılır.

-Buradan alınan 180 L kültür Eppendorf tüpüne aktarılıp, üzerine 20 L polymyxin çözeltisi ilave edilir (Polymyxin zeltisi: 5 mg Polymyxin B sulfatı 1 mL damıtık suda çözülür). 35-37 C'da 10 dakika inkübe edilir ve oda sıcaklığına soğutulur. Polimiksin, oluşan verotoksinlerin ortama salgılanmasını sağlar.

-Eppendorf tüpü tp karıştırıcıda yavaşça karıştırılır ve buradan 160 L (Pastör pipeti ile 5 damla) alınıp, test kitinin örnek gözüne aktarılır. 20 dakika içinde "C" kontrol penceresinde kırmızı Şerit görülmelidir. VT1 ve VT2 olarak gösterilen test pencerelerinde kırmızı Şerit oluşması test edilen kolonilerden en az birisinde (diğer bir deyiş ile örnek) sırası ile VT1 ve/ veya VT2 üreten bakterinin bulunduğunu gösterir. VT1 ve VT2'nin ayrı pencerelerde izlenmesi bu toksinlerden biri ya da ikisinin oluşturulduğunu gösterir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar ve Duopath Verotoxins test sonucu negatif olan kitler de dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan ve kullanılmış tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.

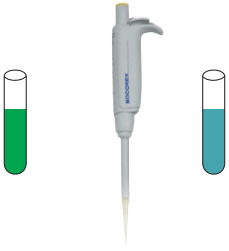
**Not:** Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.



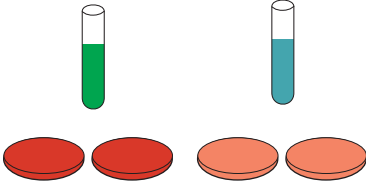
25 g (mL) gıda, 225 mL TPS (Merck 1.07228) ile homojenize edilir.



Homojenizat 35-37 °C'da 16-20 saat inkübasyona bırakılır.



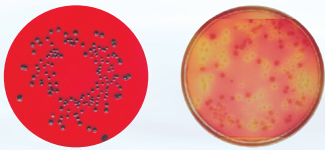
İnkübasyondan sonra selektif zenginleştirme besiyerlerine ekim yapılır. Selektif zenginleştirmede 10 mL RVS Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 0,1 mL eklenir ve inkübasyon  $41,5 \pm 1$  °C'da  $24 \pm 3$  saat olarak yapılır. Paralel olarak 10 mL MKTTn Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 1 mL eklenir ve inkübasyon  $37 \pm 1$  °C'da  $24 \pm 3$  saat olarak yapılır.



İnkübasyondan sonra her 2 selektif zenginleştirme kültüründen biri XLD Agar, diğeri kullanıcının tercihine bırakılan bir selektif katı besiyerine öze ile ayrı ayrı sürme yapılır. XLD Agar,  $37 \pm 1$  °C'da  $24 \pm 3$  saat olarak inkübasyona bırakılır. Diğere selektif katı besiyerinin inkübasyonu için Merck Microbiology Manuel'e başvurulmalıdır.



Petri kutuları 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Salmonella, XLD Agar besiyerinde renksiz (besiyeri ile aynı renkte; kırmızı) ve siyah merkezli koloniler oluşturur. Tipik koloniler ayrı ayrı olmak üzere Triple Sugar Iron (TSI) Agar, Urea Broth ve Lysine Iron Agar besiyerinde tanımlanır. İlave biyokimyasal testler yapılması da önerilmektedir. Çalışma serolojik esaslı testler ile bitirilir. Singlepath Salmonella bu amaçla kullanılmaktadır.



Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

25 g (mL) gıda örneğinde *Salmonella*, selektif olmayan besiyerinde ön zenginleştirme, 2 farklı besiyerinde selektif zenginleştirme, 2 farklı selektif katı besiyerine sürme ve tipik kolonilerin biyokimyasal ve serolojik testlerle doğrulanması olan standart var/ yok yöntemiyle analiz edilir. Ürün çeşidine göre ön zenginleştirme besiyerinde çeşitli modifikasyonlar yapılabilmektedir.

### **Kullanılan Malzeme**

Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)  
Muller-Kauffmann Tetrathionate- Novobiocin (MKTTn) Broth; (Merck 1.05878)  
Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth (Merck 1.07700)  
Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck 1.05287)  
Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar (Merck 1.10747)  
Rambach Agar (Merck 1.07500)  
XLT4 Agar (Merck 1.13919)  
XLT4 Supplement (Merck 1.08981)  
Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)  
Urea Broth (Merck 1.08483)  
Lysine Iron Agar (Merck 1.11640)  
Singlepath Salmonella (Merck 1.04140)

### **Analiz**

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa 25 gram katı gıda 225 mL Tamponlanmış Peptonlu Su besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir.

-Homojenizat, selektif olmayan ön zenginleştirme amacı ile  $37\pm 1$  °C'da 18 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

-İnkübasyondan sonra selektif zenginleştirme besiyerlerine ekim yapılır. Selektif zenginleştirmede 10 mL RVS Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 0,1 mL eklenir ve inkübasyon  $41,5\pm 1$  °C'da  $24\pm 3$  saat olarak yapılır. Paralel olarak 10 mL MKTTn Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 1 mL eklenir ve inkübasyon  $37\pm 1$  °C'da  $24\pm 3$  saat olarak yapılır.

-İnkübasyondan sonra her 2 selektif zenginleştirme kültüründen biri XLD Agar, diğeri kullanıcının tercihine bırakılan bir selektif katı besiyerine öze ile ayrı ayrı sürme yapılır. XLD Agar,  $37\pm 1$  °C'da  $24\pm 3$  saat olarak inkübasyona bırakılır. Diğer selektif katı besiyerinin inkübasyonu için Merck Microbiology Manuel'e başvurulmalıdır.

-*Salmonella*, XLD Agar besiyerinde renksiz (besiyeri ile aynı renkte; kırmızı) ve siyah merkezli koloniler oluşturur. Diğer selektif katı besiyerinde tipik *Salmonella* koloni morfolojisi için Merck Microbiology Manuel'e başvurulmalıdır.

-Her besiyerinden en az 1 adet tipik koloni alınıp tekrar XLD Agara sürülerek koloni morfolojisi doğrulanır. Tipik koloni yoksa, her besiyerinden 5 koloninin XLD Agara sürülmesi önerilmektedir.

-XLD Agar,  $37\pm 1$  °C'da  $24\pm 3$  saat olarak inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda oluşan tipik koloniler ayrı ayrı olmak üzere Triple Sugar Iron (TSI) Agar, Urea Broth ve Lysine Iron Agar besiyerinde tanımlanır. İlave biyokimyasal testler yapılması da önerilmektedir. Çalışma serolojik esaslı testler ile bitirilir. Singlepath Salmonella bu amaçla kullanılmaktadır.

-Selektif katı besiyerlerinden herhangi birisinden izole edilen kolonilerden 1 adedi dahi *Salmonella* olarak tanımlanırsa "analiz edilen 25 g (mL) gıdada *Salmonella* vardır" şeklinde rapor verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

	<p>25 g (mL) gıda 225 mL TPS (Merk 1.07228) besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.</p>
	<p>İnkübasyon: 37 °C 'da 18±2 saat</p>
 <p>0.1 ml → 10 ml</p>	<p>TPS kültüründen 0,1 mL alınıp 10 mL RVS Broth besiyerine aktarılır.</p>
	<p>İnkübasyon: 41,5 °C'da 24±3 saat</p>
 <p>1-2 ml</p>	<p>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.</p>
	<p>Oda sıcaklığına getirilir.</p>
 <p>160 µL</p>	<p>Singlepath Salmonella kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.</p>
	<p>20 dakika beklenir.</p>
	<p>Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>Salmonella</i> pozitif, olmazsa <i>Salmonella</i> negatif olarak değerlendirilir.</p>
	<p>Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika.</p>
	<p>Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.</p>

*Salmonella*, yeryüzünde en fazla sayıda hastalık ve ölümlere yol açan gıda kaynaklı patojenlerden birisidir. Standart kültürel yöntemlerle analizi 4-5 gün sürmektedir. Singlepath *Salmonella* kiti kullanılarak, selektif zenginleştirme sonrasında *Salmonella* varlığı ya da yokluğu belirlenebilir.

**Not 01:** Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

## Kullanılan Malzeme

Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)  
Rappaport Vassiliadis Soy Broth (Merck 1.07700)  
Singlepath *Salmonella* (Merck 1.04140)

## Analiz

Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa 25 gram katı gıda 225 mL Tamponlanmış Peptonlu Su besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir.

-Homojenizat, selektif olmayan ön zenginleştirme amacı ile  $37\pm 1$  °C'da 18 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

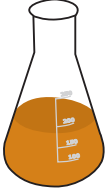
-İnkübasyondan sonra 10 mL RVS Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 0,1 mL eklenir ve inkübasyon  $41,5\pm 1$  °C'da  $24\pm 3$  saat olarak yapılır.

-İnkübasyon bitiminde bu kültürden uygun bir tüpe (tercihen polipropilen) 1-2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) Singlepath *Salmonella* kitine uygulanır. 20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Bu, çizgi kitin doğru çalıştığını kanıtlar. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde, dolayısı ile gıdada *Salmonella* olduğunu gösterir. Pozitif sonuç alındığında standart bir katı besiyerine sürme yapıp sonucun doğrulanması önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuç alınırsa analize devam etmenin gereği yoktur. Bu yöntemde toplam analiz süresi 42 saat 35 dakikadır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar ve Singlepath *Salmonella* test sonucu negatif olan kitler de dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan ve kullanılmış tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.

## Listeria monocytogenes Analizi (Var/ Yok Testi)

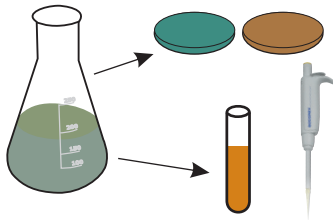
A12



25 g (mL) gıda, 225 mL 1/2 Fraser Broth (Merck 1.10398 ve Merck 1.10399) ile homojenize edilir.



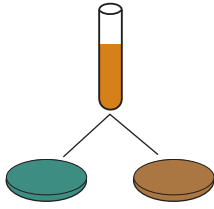
Homojenizat 30 °C'da 24 saat inkübe edilir. Gıdadaki Listeria'nın hasar görmüş olduğu düşünülüyorsa selektif katkısı ilave edilmemiş Fraser Broth besiyerinde homojenize edilip, 30 °C'da 4 saat kendi halinde bırakılır. Daha sonra selektif katkı ilave edilip aynı sıcaklıkta 20 saat daha inkübe edilir.



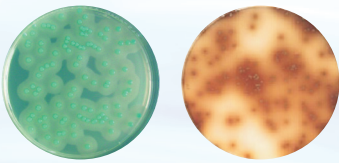
30 °C'da toplam 24 saat inkübasyondan sonra biri "Chromocult Listeria Selective Agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI" ile diğeri kullanıcının tercihine bırakılmış bir başka selektif katkı besiyerine (Oxford Agar veya PALCAM Agar) sürme yapılır, paralel olarak bu ön zenginleştirme kültüründen selektif katkıları tam konsantrasyonda ilave edilmiş 10 mL Fraser Broth'a 0,1 mL ilave edilir. Bu besiyeri 35-37 °C'da 48 saat inkübe edilir. Inkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde biri "Chromocult Listeria Selective Agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI" ile diğeri kullanıcının tercihine bırakılmış bir başka selektif katkı besiyerine (Oxford Agar veya PALCAM Agar) sürme yapılır.



Tam kuvvette Fraser Broth 35-37 °C'da 48 saat, PALCAM ve Oxford Agar 35-37 °C'da 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.



Chromocult Listeria Selective Agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI besiyerinde mavi-yeşil renkli, opak haleli koloniler *Listeria monocytogenes* olarak değerlendirilir. PALCAM Agar'da 1,5-2 mm çapında, zeytin yeşili gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu, Oxford Agar'da 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.



Kullanılmış tüm malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

ISO 11290 revize edilmektedir. Burada [www.mikrobiyoloji.org](http://www.mikrobiyoloji.org)'nin önerdiği yöntem verilmektedir.

**Kullanılan Malzeme ve Katkıları**

Fraser Broth Base (Merck 1.10398)  
Fraser Listeria Ammonium iron (III) Citrate Supplement (Merck 1.00092)  
Fraser Listeria Selective Supplement (Merck 1.00093)  
Chromocult Listeria Selective Agar Base acc. OTTAVIANI and AGOSTI (Merck 1.00427)  
Listeria Agar Selective Supplement (Merck 1.00432)  
Listeria Agar Enrichment Supplement (Merck 1.00439)  
PALCAM Agar (Merck 1.11755)  
PALCAM Agar Selective Supplement (Merck 1.12122)  
Oxford Agar (Merck 1.07004)  
Oxford Agar Selective Supplement (Merck 1.07006)

**Analiz**

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa 25 gram katı gıda 225 mL 1/2 (yarım kuvvette) Fraser Broth besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir. Fraser Broth'un yarım konsantrasyonda ilave edilecek olan katkıları, amaca göre homojenizasyon öncesinde ya da sonrasında ilave edilebilir. Gıdada hasar görmüş *Listeria* olmasından kuşku duyuluyorsa 30 °C'da 4 saat inkübasyona bırakılması ve sonra selektif katkı ilave edilmesi önerilir.

-30 °C'da toplam 24 saat inkübasyondan sonra biri "Chromocult Listeria Selective Agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI" ile diğeri kullanıcının tercihine bırakılmış bir başka selektif katı besiyerine (Oxford Agar veya PALCAM Agar) sürme yapılır, paralel olarak bu ön zenginleştirme kültüründen selektif katkıları tam konsantrasyonda ilave edilmiş 10 mL Fraser Broth'a 0,1 mL ilave edilir. Bu besiyeri 35-37 °C'da 48 saat inkübe edilir. Inkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde biri "Chromocult Listeria Selective Agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI" ile diğeri kullanıcının tercihine bırakılmış bir başka selektif katı besiyerine (Oxford Agar veya PALCAM Agar) sürme yapılır

-Bütün selektif katı besiyerleri 37 °C'da 24±3 saat, gerekirse 48 saat inkübe edilir. Inkübasyon sıcaklığı analiz raporuna kaydedilir.

-Şüpheli koloniler TSYE Agar besiyerine ayrı ayrı sürülür. 37 °C'da 24±3 saat inkübasyon sonunda bu besiyerinde oluşan koloniler tanımlanır.

-Hangi aşamadan gelirse gelsin, *Listeria monocytogenes* belirlenirse analiz raporu "25 g (mL) gıdada *Listeria monocytogenes* vardır" şeklinde, hangi aşamadan gelirse gelsin, *Listeria* spp. belirlenir ancak bunun *L. monocytogenes* olmadığı saptanırsa analiz raporu "25 g (mL) gıdada *L. monocytogenes* yoktur ancak, *Listeria* spp. vardır" şeklinde, her 3 aşamada da *Listeria* türüne rastlanmaz ise analiz raporu "25 g (mL) gıdada *Listeria* yoktur" şeklinde yazılır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.

**Not 01:** *Listeria* analizinde Fraser Broth bazal besiyerine ilave edilen katkılar yarım ve tam kuvvette olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda ilave edilir. Fraser Broth katkılarının en ekonomik kullanımı için 4 gıda paralel olarak analiz edilir. Bu amaçla 4 adet 225 mL ile 4 adet 10 mL Fraser Broth hazırlanır.

**Not 02:** Fraser Broth, katkı ilave edildiği gün kullanılmalıdır. Buna göre birinci gün erlenlere katkı ilavesinden sonra selektif katkı olan şişe (vial) dondurulur, amonyum demir (III) sitrat buzdolabında saklanır. Dondurulmuş katkı, çözüldükten sonra tekrar dondurulmaz.

	<p>25 g (mL) Gıda örneği, 225 mL 1/2 (yarım kuvvette) Fraser Broth besiyeri içinde homojenize edilir.</p>
	<p>İnkübasyon: 28-30 °C'da 21-24 saat.</p>
	<p>0,1 mL kültür, 1/1 (tam kuvvette) 10 mL Fraser Broth'a inoküle edilir.</p>
	<p>İnkübasyon: 28-30 °C'da 21-24 saat.</p>
	<p>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.</p>
	<p>Oda sıcaklığına getirilir.</p>
	<p>Singlepath® L'mono kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.</p>
	<p>20 dakika beklenir.</p>
	<p>Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa Listeria monocytogenes pozitif, olmazsa Listeria monocytogenes negatif olarak</p>
	<p><b>Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika.</b></p>
	<p>Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.</p>

*Listeria monocytogenes*, yeryüzünde en fazla sayıda hastalık ve ölümlere yol açan gıda kaynaklı patojenlerden birisidir. Standart kültürel yöntemlerle analizi 4-5 gün sürmektedir. Singlepath L'mono kiti kullanılarak, selektif zenginleştirme sonrasında *Listeria monocytogenes* varlığı ya da yokluğu belirlenebilir.

Singlepath Listeria hızlı test kitinden farklı olarak Singlepath L'mono kiti, sadece *Listeria monocytogenes* belirlenmesine yöneliktir. Singlepath Listeria kullanımında, flagella antijeninin belirlenmesine yönelik olarak mutlaka 28-30 °C'da inkübasyon gerekli iken, Singlepath L'mono kitinde böyle bir zorunluluk yoktur.

**Not 01:** Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

**Not 02:** Singlepath® L'mono kitinin, düşük konsantrasyonda *Listeria monocytogenes* içeren yüksek refakatçi floralı çiğ et ve diğer gıdalarda *Listeria monocytogenes*'i tespit edemediği gösterilmiştir. Etik kurallar ölçüsünde verilen bu açık bildirgenin, kullanıcı tarafından benzer amaçla kullanılan farklı markalar için de sorgulanması önerilir.

### Kullanılan Malzeme

Fraser Broth Base (Merck 1.10398)

Fraser Listeria Ammonium iron (III) Citrate Supplement (Merck 1.00092)

Fraser Listeria Selective Supplement (Merck 1.00093)

### Analiz

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Homojenizasyonda blender ya da stomacher kullanılacaksa 25 gram katı gıda 225 mL 1/2 (yarım kuvvette) Fraser Broth besiyeri içinde homojenize edilir. 25 mL sıvı gıda doğrudan bu besiyerine eklenir. Fraser Broth'un yarım konsantrasyonda ilave edilecek olan katkıları, amaca göre homojenizasyon öncesinde ya da sonrasında ilave edilebilir. Gıdada hasar görmüş *Listeria monocytogenes* olmasından kuşku duyuluyorsa 30 °C'da 4 saat inkübasyona bırakılması ve sonra selektif katkı ilave edilmesi önerilir.

-İnkübasyondan sonra 10 mL 1/1 kuvvetindeki Fraser Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 0,1 mL eklenir ve inkübasyon 28-30 ya da 35-37 °C'da 21-24 saat olarak yapılır.

-Kullanıcının tercihine göre diğer *Listeria* zenginleştirme besiyerleri de kullanılabilir. Her koşulda ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme yapılması önerilmektedir.

-Selektif zenginleştirme sonrasında bu kültürden uygun bir tüpe (tercihen polipropilen) 1-2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) Singlepath L'mono kitine uygulanır. 20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Bu, çizgi kitin doğru çalıştığını kanıtlar. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde, dolayısı ile gıdada *Listeria monocytogenes* olduğunu gösterir. Pozitif sonuç alındığında selektif zenginleştirme kültüründen standart bir katı besiyerine sürme yapıp sonucun doğrulanması önerilir. Tersine olarak, bu test kiti ile negatif sonuç alınırsa analize devam etmenin gereği yoktur. Bu yöntemde toplam analiz süresi 42 saat 35 dakikadır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar ve Singlepath L'mono test sonucu negatif olan kitler de dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan ve kullanılmış tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.



25 g (mL) gıda, 225 mL Bolton Broth ile homojenize edilir.



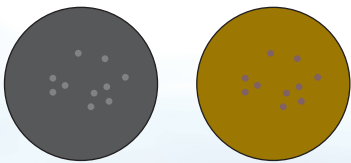
Besiyeri önce 37 °C'da 4 saat, sonra 41,5 °C'da 42-44 saat süre ile inkübasyona bırakılır



mCCDA ve Campylobacter Selective Agar besiyerlerine sürme yapılır



İnkübasyon: 41,5 °C'da 24-48 saat; mikroaerofilik



mCCDA besiyerinde grimsi, düz, ıslak görünümlü ve yayılma eğiliminde olan koloniler ile Campylobacter Selective Agar besiyerinde gelişen gri-kahverengi berrak zonlu koloniler *C. jejuni* ya da *C. coli* olarak değerlendirilir



Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

*Campylobacter jejuni*, *Salmonella* ile birlikte kayda geçmiş en fazla hastalığa yol açan gıda kaynaklı patojenlerdir. ISO 10272'ye göre analizi temel olarak 41,5 °C'da zenginleştirme, selektif katı besiyerine sürme şeklinde yapılan var/ yok testidir. *Campylobacter* analizi yapılacak gıda dondurulmamalı, gerekli ise buzdolabı sıcaklığında tutulmalı, olanaklar ölçüsünde hızla analiz yapılmalıdır. Aksi halde sahte negatif sonuçlar alınabilir.

**Kullanılan Malzeme, Katkıları ve Diğer Malzeme**

Bolton Selective Enrichment Broth (Merck 1.00068)  
Bolton Broth Selective Supplement (Merck 1.00069)  
CCDA, modified (mCCDA; Merck 1.00070)  
CCDA Selective Supplement (Merck 1.00071)  
Campylobacter Selective Agar (Merck 1.02248)  
Campylobacter Selective Supplement (Merck 1.02249)  
Mikroaerofilik İnkübasyon Gereçleri

**Analiz**

-Gıda örneği mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir, 25 g (mL) alınıp, 250 mL vida kapaklı cam şişede hazırlanmış 225 mL Bolton Broth besiyerine ilave edilir. *Campylobacter* mikroaerofilik bir bakteri olduğu için homojenizasyonu sırasında aşırı oksijen teması bakteriye zarar vererek sahte negatif sonuçlara neden olur. Bu nedenle blender kullanılmasından olabildiğince kaçınılmalıdır. Eğer vida kapaklı cam şişe yerine erlen kullanılıyor ise inkübasyon mikroaerofil koşullarda yapılmalıdır.

-Besiyeri önce 37 °C'da 4 saat, sonra 41,5 °C'da 42-44 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda mCCDA ve Campylobacter Selective Agar besiyerlerine sürme yapılır ve Petri kutuları 41,5 °C'da 24-48 saat süre yine mikroaerofilik ortamda inkübe edilir. İnkübasyonun ilk 24 saatinde Petri kutuları incelenir, tipik koloni görülmemesi durumunda inkübasyona 24 saat daha devam edilir.

-mCCDA besiyerinde grimsi, düz, ıslak görümlü ve yayılma eğiliminde olan koloniler ile Campylobacter Selective Agar besiyerinde gelişen gri-kahverengi berrak zonlu koloniler *C. jejuni* ya da *C. coli* olarak değerlendirilir.

-Tipik *Campylobacter* kolonilerine rastlanması halinde "25 g (mL) örnekte *Campylobacter jejuni* ve/ veya *C. coli* vardır" şeklinde standart rapor verilir.

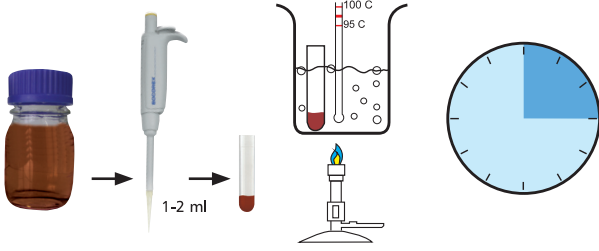
-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.



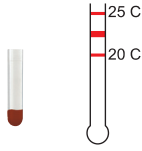
25 g yada 25 mL gıda 225 Bolton Broth (Merck 1.00068 ve Merk 1.00069) besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.



İnkübasyon: 37 °C 'da 4 saat ve ilaveten 41,5 °C 'da 44 saat.



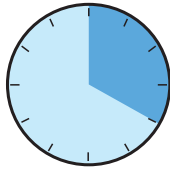
Selektif zenginleştirme kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.



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.

**Not:** Test kiti analizden 2 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığına getirilmeli ve alüminyum poşeti açıldıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmalıdır.

### Kullanılan Malzeme

Bolton Selective Enrichment Broth (Merck 1.00068)  
Bolton Broth Selective Supplement (Merck 1.00069)  
Singlepath *Campylobacter* (Merck 1.04143)  
Anaerobik İnkübasyon Gereçleri

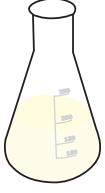
### Analiz

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Gıdada hasar görmüş *Campylobacter* olmasından endişe ediliyorsa, besiyeri önce 37 °C'da 4 saat süre ile mikroaerofilik ortamda inkübe edilir, sonra inkübasyon sıcaklığı 41,5 °C'a çıkarılıp inkübasyona 44 saat daha devam edilir. Eğer vida kapaklı cam şişe yerine erlen kullanılıyor ise inkübasyon mikroaerofilik koşullarda yapılmalıdır.

-Toplam 48 saat süren inkübasyondan sonra bu kültürden cam bir tüpe 1-2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur ve oda sıcaklığına geldiğinde 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) Singlepath *Campylobacter* kitine uygulanır.

-20 dakika sonunda kontrol "C" penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test "T" penceresinde de kırmızı şerit görülmesi analiz edilen kültürde *Campylobacter* olduğunu gösterir. Pozitif sonuçta selektif bir agara sürme yapıp sonucun doğrulanması önerilir. Negatif sonuçta analize devam etmenin gereği yoktur.

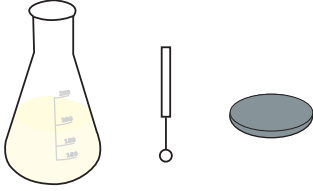
-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar ve Singlepath *Campylobacter* test sonucu negatif olan kitler de dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan ve kullanılmış tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.



25 g (mL) gıda, 225 mL LST ya da EE Broth besiyerinde homojenize edilir.



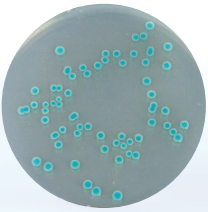
İnkübasyon: 37 °C'da 24 saat



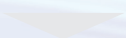
Chromocult® Enterobacter sakazakii besiyerine sürme yapılır



İnkübasyon: 44 °C'da 24 saat



İnkübasyon sonunda *Enterobacter sakazakii* kolonileri mavi-yeşil renkli görülür.



Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

Bakterinin ismi, *Cronobacter sakazakii* olarak değiştirilmiştir.

**Not 01:** Bu analizde inkübasyon sıcaklığı kritiktir. 45 °C üzerinde *Enterobacter sakazakii* gelişmez. 43 °C altında ise refakatçi bakteri baskılaması ortadan kalkar ve gelişen refakatçi flora, hedef bakterinin fark edilmesini maskeleyebilir.

### **Kullanılan Malzeme**

Buffered Peptone Water (Merck 1.07228)

Lauryl Sulfate Broth; LST (Merck 1.10266)

Enterobacteriaceae Enrichment Broth acc. to MOSSEL; EE Broth (Merck 1.05394)

Chromocult® Enterobacter sakazakii (Merck 1.00873)

### **Analiz**

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve zenginleştirme besiyerinde homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

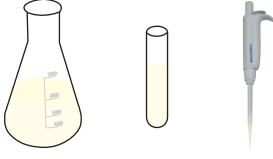
-Zenginleştirme için LST ya da EE Broth kullanılabilir. Bu besiyerleri standart olarak 37 °C'da 24±2 saat inkübe edilir.

-Bazı standartlarda Buffered Pepton Water ortamında selektif olmayan ön zenginleştirmeden sonra LST ya da EE Broth'a geçiş önerilmektedir.

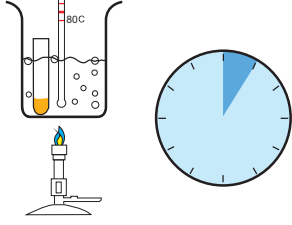
-Zenginleştirme sonrası 1 öze kültür Chromocult® Enterobacter sakazakii besiyerine sürülür ve Petri kutusu 44±1 °C'da 24±2 saat inkübasyona bırakılır.

-İnkübasyon sonunda mavi-yeşil renkli koloniler *Enterobacter sakazakii* olarak değerlendirilir. Refakatçi flora renksiz koloniler oluşturur.

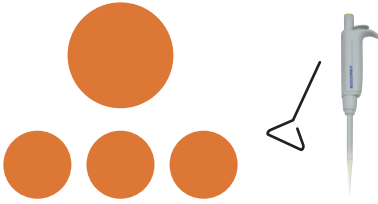
-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.



10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi kullanılır. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.



80 °C'da 5 dakikalık pastörizasyon uygulanıp hızla soğutulur.



1 mL homojenizat 3 standart Petri kutusundaki MYP Agar (Cereus Selective Agar acc. to Mossel) besiyerine dağıtılır. Alternatif olarak 14 cm çaplı büyük Petri kutusu da kullanılabilir



İnkübasyon: 28 °C'da 24-48 saat



Yaygın, kuru, pembe-menekşe merkezli ve etrafında yoğun bir presipitat olan koloniler *Bacillus cereus* olarak sayılır



Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

*Bacillus cereus*, toprak kökenli bakteri olup, gıda zehirlenmelerine yol açar. Baharat gibi gıdalarda sınırlı sayıda bulunmasına izin verilebilir. UHT yöntemi ile üretilen uzun ömürlü sütlerde de bozulmaya neden olur.

**Not 01:** Gıdalarda *B. cereus* analizinde *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. mycooides* de *B. cereus* gibi tipik koloniler verir. Bu kolonilerin standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında *B. cereus* olup olmadıklarının belirlenmesi oldukça zordur. Bununla beraber, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. mycooides* gıdaların günlük analizinde oldukça nadir olarak ortaya çıkarlar. Bu nedenle tipik koloniler *B. cereus* olarak kabul edilir.

**Not 02:** Sadece *B. cereus* sporlarının analizi isteniyor ise sporlu bakterilerin analizi kurallarına uyularak homojenizat (ya da örnek sıvı ise doğrudan örneğin kendisi) 80 °C'da 5 dakika pastörize edilir. Analiz, standart olarak bu şekilde yapılır. Pastörizasyon sonrasında sayılacak olanlar sadece, pastörizasyon öncesi spor oluşturmuş olan bakterilerdir. Vejetatif formdaki *B. cereus* hücreleri pastörizasyon işlemi ile öleceği için sayılamaz. Dolayısı ile analiz sonucu toplam *B. cereus* sayısını değil, spor oluşturmuş olanların sayısını verecektir.

### Kullanılan Malzeme ve Katkıları

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)  
MYP Agar (Cereus Selective Agar acc. to Mossel; Merck 1.05267)  
Bacillus cereus Selective Supplement (Merck 1.09875)  
Egg-yolk Emulsion (Merck 1.03784)

### Analiz

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/ veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Tüp içindeki örnek, kaynar su banyosuna daldırılır, aynı çeper kalınlığındaki tüpte bulunan bir diğer örneğe termometre yerleştirilir.

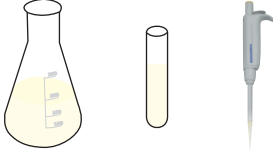
-Kontrol tüpündeki sıcaklık 80 °C'a eriştiğinde her iki tüp su banyosundan çıkarılır, kontrol tüpünün sıcaklığı kontrol edilerek sıcaklık 79 °C'a düştüğünde tekrar kaynar su banyosuna beraberce daldırılırlar. Bu şekilde 5 dakika tutulduktan sonra test tüpü oda sıcaklığındaki su banyosuna alınır ve soğutulur. Pek çok uluslararası standartta soğutmanın buz banyosu içinde ve hızla yapılması gerektiğine dikkat çekilir. Soğutma şekli ilgili talimatta yazılmalıdır.

-Gerekli ise seyreltmeler bu aşamada (pastörizasyondan sonra) yapılır.

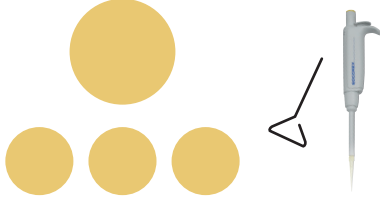
-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/ veya uygun seyrelti(ler) den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-İnkübasyon sonunda (28 °C'da 48 saat) MYP Agar besiyerinde yaygın, kuru, pembe-menekşe merkezli ve etrafında yoğun bir presipitat olan koloniler *Bacillus cereus* olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.



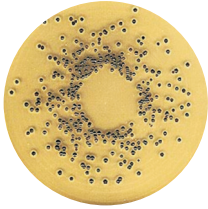
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. süt ve ürünlerinde tercihen  $\frac{1}{4}$  Ringer çözeltisi kullanılır. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.



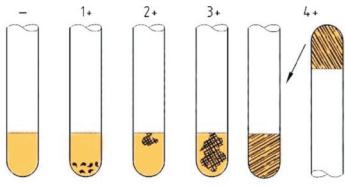
1 mL homojenizat 3 standart Petri kutusundaki Baird-Parker Agar besiyerine dağıtılır. Alternatif olarak 14 cm çaplı büyük Petri kutusu da kullanılabilir.



İnkübasyon: 37 °C'da 24 saat



Etrafı saydam zonlu 1-1,5 mm çaplı siyah parlak koloniler *S. aureus* olarak sayılır



Şüpheli kolonilere koagülaz testi uygulanır.



Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

*S. aureus*, patojen bir bakteridir ve intoksikasyon tipi gıda zehirlenmelerine neden olur. İşlem görmüş gıdalarda bulunmasına izin verilmez ancak, çiğ et gibi gıdalarda az sayıda bulunmasına izin verilebilir. Buna göre arama ya da sayma yöntemi kullanılır. Gıdadaki varlığı her zaman zehirlenme yapacağı anlamına gelmez. Toksin oluşturması gıdanın asitliği, kuru maddesi vb. faktörlere bağlıdır.

ISO 6888'e göre gıdalarda *S. aureus* sayısı katı besiyerinde standart kültürel yöntemle belirlenir.

**Not 01:** Bazal besiyeri, otoklavda sterilize edilip, 45-50 °C'a soğutulur ve yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu bu aşamada ilave edilir. Yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu buzdolabında saklanması gereken bir katkıdır. Buzdolabından çıkarıldığı gibi bazal besiyerine eklenirse yer yer jelleşmeler olur. Bu emülsiyon önceden buzdolabından çıkartılıp, oda sıcaklığında iken bazal besiyerine eklenmelidir.

**Not 02:** Yumurta sarısı-tellurit emülsiyonunun sterilitesi kontrol edilmelidir. Bu amaçla her parti besiyeri hazırlanması sonrasında ekim yapılmamış 1 adet Baird-Parker Agar besiyerinin kontrol olarak inkübasyona bırakılması önerilir.

### **Kullanılan Malzeme**

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)  
Baird-Parker Agar Base (Merck 1.05406)  
Egg-yolk Tellurit (Merck 1.03785)  
Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

### **Analiz**

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/ veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Otoklavda sterilize edilmiş Baird-Parker Agar bazal besiyerine yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu ilavesi 45-50 °C sıcaklıkta yapılır. Bu emülsiyon, önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.

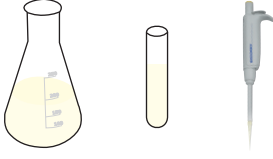
-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/veya uygun seyreltiler) den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır. Yayma yönteminde sıvı gıda örneğinden ya da 10<sup>-1</sup> seyreltiden 1 mL alınıp standart boy 3 Petri kutusuna eşit olarak dağıtılır. 14 cm çaplı Petri kutusu kullanılıyorsa 1 mL örnek ya da homojenizat Petri kutusuna aktarılır. Standart gıda analizinde daha fazla seyreltmeye gerek yoktur. Ekimden sonra Petri kutusu 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.

-Baird-Parker Agar besiyerinde etrafı saydam zonlu 1-1,5 mm çaplı siyah parlak koloniler *S. aureus* olarak sayılır ve örnekteki sayı standart yöntemle hesaplanır. Bu besiyerinde zonsuz, 0,5-1,5 mm çapındaki siyah ve parlak koloniler mikrokok olarak değerlendirilir.

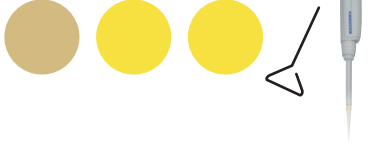
-İnkübasyon sonrasında Baird-Parker besiyerinin 1 gece buzdolabında tutulması ile, lesitinaz aktivitesine bağlı olan berrak zon oluşumu daha belirgin olarak izlenebilir.

-Gerekliyse, tipik ya da şüpheli kolonilere Bactident Coagulase kullanılarak koagülaz testi yapılır.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dâhil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.



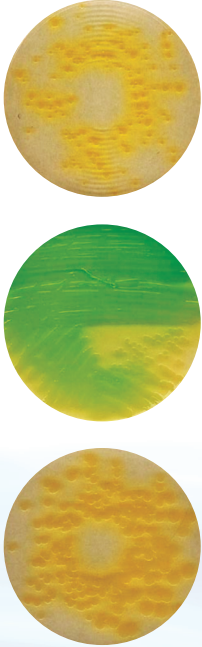
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. süt ve ürünlerinde tercihen  $\frac{1}{4}$  Ringer çözeltisi kullanılır. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.



Homojenizat *Pseudomonas* Selective Agar Base (Cetrimide Agar) ve/veya *Pseudomonas* Selective Agar Base besiyerine ekilir. *Pseudomonas* Selective Agar Base besiyeri, CN ya da CFC katkıları ile hazırlanır.



Cetrimide Agar 35-37 °C'da 48 saat, *Pseudomonas* CN Selective Agar 36±2 °C'da 22±2 saat ve gerekirse 44±4 saat, *Pseudomonas* CFC Selective Agar 25±1°C'da 44±4 saat inkübe edilir.



Cetrimide Agar'da sarı-yeşil pigmentli ve uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışığa veren koloniler, *Pseudomonas* CN Selective Agar'da mavi-yeşil pigmentli koloniler *Ps. aeruginosa* olarak değerlendirilir. *Pseudomonas* CFC Selective Agar'da 2 mm çapında sarı renkli koloniler muhtemel *Ps. aeruginosa* olarak değerlendirilir. Oksidaz pozitif, glikoz negatif koloniler *Ps. aeruginosa* olarak doğrulanır.



Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

Psikrofil/ psikrotrof karakterleri ile soğukta tutulan gıdalarda saprofit olarak bozulmalara neden olan, Gram negatif, çubuk şeklinde bakterilerdir. *P. aeruginosa*, hastane enfeksiyonlarının başlıca etmenidir ve bu nedenle klinik mikrobiyolojide oldukça önemlidir. *Pseudomonas* türleri özellikle et ve süt ürünlerinde doğrudan ve/veya kuvvetli proteaz ve lipaz enzimleri ile bozulmalara neden olurlar. UHT sütlerde tatlı pıhtılaşma etmenlerinden birisidir. Çiğ sütün sağımdan UHT'ye işlenmesine kadar geçen süre içinde proteaz enzimlerini salgılar. UHT'ye işleme sırasında bakteri tümüyle ölmekle beraber, proteaz enzimi stabilitesini korur ve zamanla tatlı pıhtılaşma denen bozulmaya neden olur.

**Not 01:** *Pseudomonas* cinsine giren 140 tür, doğada çok yaygındır. Bunlardan 25 kadarı insanlar için önemlidir. Klinik mikrobiyolojide, klorlanmış havuz suları vb. örneklerde farklı analiz yöntemleri bulunmakla birlikte, bu metinde gıdalardaki analiz yöntemi, temel gıda mikrobiyolojisi analiz yaklaşımı ile verilmiştir.

**Not 02:** *Pseudomonas* Selective Agar Base besiyeri, CN katkısı kullanıldığında EN ISO 12780; CFC katkısı kullanıldığında EN ISO 13720'ye uygundur.

### Kullanılan Malzeme

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözültisi (Merck 1.15525)  
*Pseudomonas* Selective Agar Base (Cetrimide Agar, Merck 1.05284)  
Glycerol %87 (Merck 1.04091)  
*Pseudomonas* Selective Agar Base (Merck 1.07620)  
*Pseudomonas* CN Selective Supplement (Merck 1.07624)  
*Pseudomonas* CFC Selective Supplement (Merck 1.07627)  
UV Lamp (366 nm) (Merck 1.13203)  
Bactident Oxidase (Merck 1.13300)

### Analiz

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/ veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/ veya uygun seyrelti(ler) den yayma ya da dökme yöntemi ile amaca uygun selektif katı besiyerine ekim yapılır.

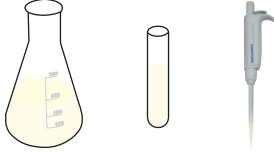
-Cetrimide Agar, özellikle *Ps. aeruginosa* için kullanılır. Bu besiyerinde 35-37 °C'da 48 saat süren inkübasyondan sonra sarı-yeşil pigmentli ve uzun dalga boylu UV lamba ile floresan ışığa veren koloniler *Ps. aeruginosa* olarak sayılır.

-*Pseudomonas* CN Selective Agar besiyeri özellikle membran filtrasyon tekniği ile kullanılır. 36±2°C'da 22±2 saat ve gerekirse 44±4 saat sonrasında mavi-yeşil pigmentli tüm koloniler *Ps. aeruginosa* olarak değerlendirilir.

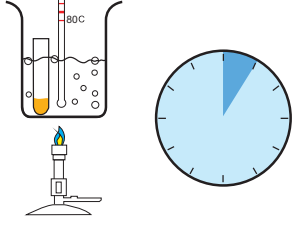
-*Pseudomonas* CFC Selective Agar besiyerine yayma yöntemi ile ekim önerilmektedir. 25±1°C'da 44±4 saat inkübasyon sonrası 2 mm çapında sarı renkli koloniler muhtemel *Ps. aeruginosa* olarak değerlendirilir. Oksidaz pozitif, glikoz negatif koloniler *Ps. aeruginosa* olarak doğrulanır.

-Analiz sonrası *Ps. aeruginosa* sayısı standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir.

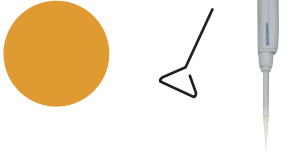
-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.



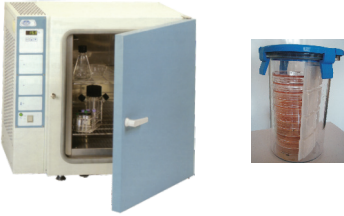
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. süt ve ürünlerinde tercihen  $\frac{1}{4}$  Ringer çözeltisi kullanılır. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.



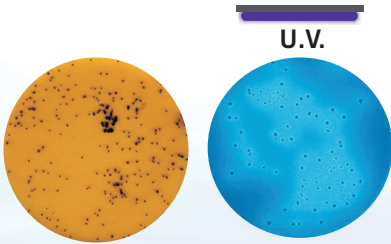
80 °C'da 5 dakikalık pastörizasyon uygulanıp hızla soğutulur.



Homojenizat Tryptose Sulfite Cyclocerine (TSC) besiyerine ekilir.



İnkübasyon: 37 °C'da 24-48 saat



Siyah renkli koloniler *Clostridium perfringens* olarak sayılır. MUP katkılı TSC Agar'da *Cl. perfringens* kolonileri uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışığa ile belirlenir



Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

Çoğu standartta değinilen "sülfite indirgeyen anaeroblar" ve "sülfite indirgeyen *Clostridium*" ile "*Clostridium perfringens*", gıda mikrobiyolojisi açısından pratikte aynı şeydir. *Cl. perfringens*, klinik mikrobiyolojide gazlı kangren etmeni olan *Cl. welchii* adı ile bilinir

**Not 01:** *Cl. perfringens* sporlu bir bakteri olmakla birlikte, vejetatif hücreleri düşük sıcaklıklara çok duyarlıdır. Bu nedenle *Cl. perfringens* analizinde gıda örneği 10-15 °C arasında tutularak olanaklar ölçüsünde hızla analize alınmalıdır. Gıdanın analizi 8 saatten sonra yapılacak ise steril gliserin-tuz çözeltisinde kuru buz kullanılarak -60 °C'da korunur.

**Not 02:** *Cl. perfringens* anaerob bakteri olduğu için homojenizasyon sırasında hava ile fazlaca temas etmemelidir.

**Not 03:** Sadece *Cl. perfringens* sporlarının analizi isteniyor ise sporlu bakterilerin analizi kurallarına uyularak homojenizat (ya da örnek sıvı ise doğrudan örneğin kendisi) 80 °C'da 5 dakika pastörize edilir. Analiz, standart olarak bu şekilde yapılır. Pastörizasyon sonrasında sayılacak olanlar sadece, pastörizasyon öncesi spor oluşturmuş olan bakterilerdir. Vejetatif formdaki *Cl. perfringens* hücreleri pastörizasyon işlemi ile öleceği için sayılmaz. Dolayısı ile analiz sonucu toplam *Cl. perfringens* sayısını değil, spor oluşturmuş olanların sayısını verecektir.

### **Kullanılan Malzeme ve Katkıları**

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)  
¼ Ringer Çözeltisi (Merck 1.15525)  
Tryptose Sulfite Cyclocerine (TSC) Agar (Merck 1.11972)  
TSC Agar Katkısı (Merck 1.00888)  
Gliserin-Tuz Çözeltisi  
Anaerobik İnkübasyon Gereçleri  
UV El Lambası Merck (1.13203)

### **Analiz**

-Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir.

-Homojenizasyon ve/ veya gerekli ise seyreltmeler için, süt ve ürünlerinde tercihen ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır. Homojenizasyonda blender kullanılacak ise düşük devir ve süre kullanılır. Gıda analizi 8 saatten daha uzun bir sürede yapılacaksa steril gliserin-tuz çözeltisinde korunur.

-Tüp içindeki örnek, kaynar su banyosuna daldırılır, aynı çeper kalınlığındaki tüpte bulunan bir diğer örneğe termometre yerleştirilir.

-Kontrol tüpündeki sıcaklık 80 °C'a eriştiğinde her iki tüp su banyosundan çıkarılır, kontrol tüpünün sıcaklığı kontrol edilerek sıcaklık 79 °C'a düştüğünde tekrar kaynar su banyosuna beraberce daldırılırlar. Bu şekilde 5 dakika tutulduktan sonra test tüpü oda sıcaklığındaki su banyosuna alınır ve soğutulur. Pek çok uluslararası standartta soğutmanın buz banyosu içinde ve hızla yapılması gerektiğine dikkat çekilir. Soğutma şekli ilgili talimatta yazılmalıdır.

-Seyreltme gerekli ise, pastörizasyondan sonra yapılır.

-Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre, sıvı örnekten ya da homojenizattan ve/ veya uygun seyrelti(ler) den yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.

-İnkübasyon sonunda (37 °C'da 24-48 saat) TSC Agar besiyerinde gelişen siyah renkli koloniler sülfite indirgeyen anaeroblar (sülfite indirgeyen *Clostridium* spp.) olarak sayılır ve standart şekilde hesaplanarak, sonuç kob/g (mL) olarak verilir. TSC Agar katkısı ilave edilmiş besiyerinde *Cl. perfringens* uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışığa ile belirlenir.

-Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/ atılır.