

Toplam Bakteri Analizi (Kaynak 1)¹

[01. Genel Bilgiler](#)

[02. Standart Analiz Yöntemi](#)

[03. Diğer Sayım Yöntemleri](#)

[03.01. Spor Sayımı](#)

[03.02. Psikrofil ve Psikrotrof Bakterilerin Sayımı](#)

[03.03. Termofillerin Sayımı](#)

[03.04. Anaerobların Sayımı](#)

[03.05. Halofil Bakterilerin Sayımı](#)

[03.06. Termoasidofilik Bakterilerin Sayımı](#)

[03.07. Süt Analizleri](#)

[04. İnkübasyon Sonrası Sayım](#)

01. Genel Bilgiler

Gıdalarda toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı standart olarak genel bir katı besiyerinde dökme ya da yayma yöntemi ile yapılır ve buna bağlı olarak yabancı kaynaklarda "aerobic plate count ; APC" ve "aerobic mesophilic count ; AMC" olarak anılır. Süt örneklerinde Breed yöntemi ile yapılan mikroskopik sayım canlı ve ölü bakteri sayısını beraberce verdiği için toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı ile aynı anlama gelmez. Bununla beraber süt işletmelerinde sütün kalitesini ivedi olarak belirlemek için bu mikroskopik sayım yaygın olarak kullanılmaktadır. Benzer şekilde toplam bakteri sayımı derinliği Howard lamından daha az olan Petroff-Hausser lamı ile de yapılabilir.

02. Standart Analiz Yöntemi

Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının belirlenmesinde genel amaçlı bir katı besiyeri olarak en yaygın kullanılan Plate Count Agar (PCA) 'dır. Bunun yanı sıra, Nutrient Agar veya Tryptic Soy Agar gibi besiyerleri de bu amaçla kullanılabilir. Sayım için standart şekilde hazırlanan gıda örneği PCA besiyerine ekilir ve inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılarak yine standart yöntemle gıda örneğindeki toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı hesaplanır. Bu yöntemde tartışma konusu olan 2 konu inkübasyon sıcaklığı ile petri kutusunda alt ve üst limitlerdeki koloni sayılarıdır.

Avrupa ülkelerinde yaygın olarak uygulanan inkübasyon sıcaklığı 30 - 32 °C iken ABD 'de bu değer 35 - 37 °C olarak benimsenmektedir. Her iki koşulda da inkübasyon süresi 48 saat olarak alınmaktadır. Avrupa Birliği resmi analiz yöntemine göre kullanılan inkübasyon parametreleri 30 °C inkübasyon sıcaklığı ve 72 saat süre şeklindedir. Genel olarak kabul edilen şekli ile 25 - 30 °C 'da yapılan sayım ile standart hijyen ya da işletme sanitasyonu, 30 -

¹ Kaynak : [Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları ; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü](#)

37 °C 'da yapılan sayım ile gıdanın potansiyel tehlikesi belirlenir. Burada dikkat edilmesi gereken tek husus inkübasyon sıcaklığı ve süresinin analiz kayıtlarına yazılmasıdır.

Standart bir petri kutusunda sayılabilecek koloni sayısının alt ve üst limitleri de farklı standart analiz kaynaklarında farklılık göstermektedir. Avrupa Birliği resmi analiz yöntemi ve ISO 'ya göre bu limitler 10 - 300 iken, BAM/AOAC 25 - 250 limitlerini kullanmaktadır.

03. Diğer Sayım Yöntemleri

Standart kültürel uygulamalar olarak, Miles-Misra yöntemi olarak da bilinen damlatma yöntemi, EMS yöntemi, membran filtrasyon tekniği, spiral plater, yaygın olarak bilinen adı Petrifilm olan yeniden ıslatılabilir kuru filimler de gıdalarda toplam aerobik mezofilik bakteri sayımında kullanılmaktadır. Bunlara ilaveten özellikle çiğ süt analizlerinde kullanılmak üzere metilen mavisi ve resazurin indirgeme testleri, kondüktans yöntemi gibi indirek sayım yöntemleri ile de gıdalarda toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı yapılabilmektedir. Bunlardan spiral plater kullanımı AOAC tarafından resmi analiz yöntemi olarak da kabul edilmiştir. Bu sayım teknikleri ilgili bölümlerde (bknz. bölüm 06 ve 34) detaylı olarak verilmiştir.

03.01. Spor Sayımı

Gıdalarda bulunan bakteri sporlarının sayımı için önce materyal pastörize edilerek bakterilerin vejetatif formları öldürülür, sonra standart ekim yapılır. Burada dikkat edilmesi gereken husus bu şekildeki analiz ile "sporlu bakterilerin" değil sadece "analiz anında mevcut sporların" sayıldığıdır. Pastörizasyon işlemi standart olarak 80 °C 'da 1 dakika olarak yapılır. Sıvı gıdalarda pastörizasyon doğrudan yapılırken, katı gıdalarda pastörizasyon işlemi homojenizasyondan sonra uygulanır.

03.02. Psikrofil ve Psikrotrof Bakterilerin Sayımı

Mezofil sınırdaki olduğu gibi psikrofil sınırdaki da bir kesinlik yoktur. Genel olarak gelişme optimumları düşük sıcaklık dereceleri olan mikroorganizmalar kriyofil, psikrofil, obligat psikrofil, fakültatif psikrofil, psikrotrof gibi farklı isimler altında toplanmaktadır. Bununla beraber en yaygın kullanılan sınıflandırma bu mikroorganizmaları psikrofil ve psikrotrof olarak 2 gruba ayırmaktadır. Bu çerçevede, belirlenecek bir sabit sıcaklıkta gıda maddesindeki tüm "soğuk seven" bakterilerin sayımı mümkün değildir. Bu durumda gıda maddelerinde en yaygın olarak bulunan bakteriler için bir sıcaklık derecesinin inkübasyon sıcaklığı olarak seçilmesi gerekmektedir. Gıda analizlerinde bu grup bakteriler için kullanılan inkübasyon normu genel olarak 5-7 °C 'da 7-10 gün şeklindedir. 4,5 °C 'da 14 gün, 6,5 °C 'da 10 gün inkübasyon da uygulanmaktadır. Analiz raporuna inkübasyon sıcaklığı ve süresinin yazılması bu bakımdan çok önemlidir.

03.03. Termofillerin Sayımı

Psikrofil ve psikrotrof bakteri sayımında inkübasyon sıcaklığı konusundaki tartışmalar termofiller için de geçerlidir. Termofil bakterilerin sayımı 45 °C 'da 2-3 gün veya 55 °C 'da 2 - 3 gün olarak seçilmektedir. Termofillerin analizinde besiyerinde kurumunun önüne geçilmesi

için petrilerin plastik torba içinde inkübe edilmesi ya da daha pratik olarak cam değil kapakları tam kapanan plastik petrilerin kullanılmasıdır.

03.04. Anaerobların Sayımı

Anaerobların sayımı için uygun bir inkübasyon sıcaklığı seçilerek anaerob koşullar altında inkübe edilir.. Genel olarak gıdalarda bulunan toplam anaerob bakteriler ile kastedilen *Clostridium* spp. olduğu için doğrudan bu bakterilerin sayımı daha doğrudur.

03.05. Halofil Bakterilerin Sayımı

Tuz ile korunan balık gibi gıdalarda bulunabilen ve gelişmeleri için en az %12 tuza gerek duyan *Halobacterium* ve *Halococcus* gibi obligat ekstrem halofillerin sayımı için genel bir besiyerine %15 NaCl (w/v) ilave edilerek besiyeri hazırlanır. Bu bakterilerin analizinde seyreltme için kullanılan çözeltide de %15 NaCl bulunmalıdır. *Vibrio* türleri de halofil olmakla beraber ekstrem obligat özellik taşımadığı için genel besiyerine %2,5 - 3 (w/v) NaCl katılması yeterlidir.

03.06. Termoasidofilik Bakterilerin Sayımı

Gıdalarda bulunabilen sporlu, termofilik ve asidofilik bakteriler pastörize meyve sularında canlılıklarını koruyarak çeşitli bozulmalara neden olabilmektedir. Bunların sayımı için basit olarak materyal pastörize edilir, yüksek asitli bir besiyerinde yüksek sıcaklıkta inkübe edilir.

03.07. Süt Analizleri

Süt ve ürünlerinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı için standart dehidre PCA besiyerine %1 skimmilk (yağsız süttozu) ilave edilir. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli husus süttozunun antibiyotik içermemesidir. Bu amaçla süt işletmelerinin ürettiği süttozu yerine mikrobiyolojik analizlerde kullanılmak üzere üretilmiş özel süttozu kullanılmalıdır. Süttozu ilave edilmiş PCA besiyeri ticari olarak hazırlanmış şekilde de sağlanabilmektedir.

04. İnkübasyon Sonrası Sayım

Meyve suları, reçeller gibi ürünler steril değildir. Burada uygulanan ısı işlem sadece patojenlerin ve normal depolama koşullarında gelişerek ürünü bozabilecek mikroorganizmaların tahribine yöneliktir. Buna göre bir pastörize meyve suyu örneğinde pastörizasyona dayanmış sporlar bulunabilir. Meyve suyunun asit ortamı bu sporların vejetatif hale geçmesini dahi engeller. Dolayısı ile bu gibi ürünlerde toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı yapılması gerekli değildir, yaygın uygulanış şekli ile biyolojik stabilite testi uygulanır. Bu amaçla gıda örneği orijinal ambalajında 37 °C 'da 10 gün süre ile inkübasyona bırakılır, kontrol örneğine göre pH 'da 0,5 'den fazla değişme, bombaj, kokuşma gibi mikroorganizma gelişmesini açık olarak gösteren örneklerin biyolojik olarak stabil olmadığına karar verilir.

İnkübasyonun termofillerin kontrolü için ayrıca 45 °C 'da da yapılması ile ürün güvenliği daha iyi korunmuş olur.

İnkübasyon sonrasında bakteri sayımı genel mikrobiyolojik analiz ilkeleri ile bağdaşmaz. Bununla beraber biyolojik stabilite testinde inkübasyon sonrasında pH, bombaj, köpürme gibi açık göstergeler yok ise ürünün güvenilir olduğuna da kesin olarak bakılamaz. Gıdada gelişebilen bakteri sayısı az ise ve/veya bu bakterilerin gıdada gelişmeleri gıdadaki asitlik veya kimyasal koruyucular ile oldukça yavaşlatılmış ise açık gösterge olarak tarif edilen değişimlerin ortaya çıkması için çok daha fazla inkübasyon süresine gerek vardır. Bu durum ise özellikle ticari ürünlerin analizinde benimsenmez. Bu durumda inkübasyon sonrasında sayım yapılarak toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı yapılarak ürün güvenliği hakkında bilgi edinilebilir. Hatta 2 kutunun inkübasyona bırakılması, bunlardan birinde 5. günde, diğerinde ise 10. günde toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı yapılması ile zamana bağlı olarak bakteri sayısındaki değişim üzerinden ürünün bakteriyolojik olarak güvenliği belirlenebilir. 10. gündeki toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının 10^4 kob/g-ml olması kayda değer bir tehlike işareti olarak kabul edilebilir. Bu sınırdan pH 'da bir değişim olmayabileceği gibi bombaj ve köpürme de görülmeyebilir ancak, daha uzun depolamada sayıdaki artışa bağlı olarak ürünün bozulacağı beklenir.

Avrupa Birliği ısı işlem görmüş sütler için benzer bir uygulamayı resmi analiz yöntemi olarak kabul etmiştir. Buna göre pastörize sütlerdeki psikrotrof bakterilerin sayımı için süt önce 6 °C 'da 5 gün inkübasyona bırakılmakta, sonra standart dökme yöntemi ile ekimi yapılan petri kutuları 21 °C 'da 25 saat inkübe edilmekte ve sayım sonucu standart yöntemle hesaplanmaktadır. Bu analiz ile soğukta depolanması gereken pastörize içme sütlerinde 5 gün boyunca psikrotrof bakterilerin hangi düzeye çıkabileceği belirlenmektedir. Benzer şekilde UHT sütlerde toplam mezofilik aerobik bakterilerin sayımı için süt önce 30 °C 'da 15 gün inkübe edilmekte ve standart ekimden sonra sayım 30 °C 'da 72 saatlik inkübasyon sonunda yapılmaktadır.