

# **Membran Filtrasyon ile Suların Mikrobiyolojik Analizi**



**Prof. Dr. Kadir HALKMAN**  
**Ankara Üniversitesi,**  
**Gıda Mühendisliği Bölümü**

**27 Mart 2014; Merck Millipore, İstanbul**

# 01a Mikrobiyolojik Analizin Temelleri

Gıda, klinik ve çevresel örneklerde çeşitli amaçlarla mikrobiyolojik analizler yapılır.

Gıdalarda ve suda bazı mikroorganizmaların (örneğin patojenler) bulunmasına hiç izin verilmez ya da gıdalarda patojen olmakla birlikte *Staphylococcus aureus* için olduğu gibi az sayıda izin verilebilir.

Patojen olmamakla birlikte bazı mikroorganizmaların belirli gıdalarda (içme ve kullanma sularında) bulunmasına izin verilmez. Örneğin, içme ve kullanma sularında toplam koliform grup bakteriler 250 mL su numunesinde sıfır sayıda olmalıdır.

# 01b Mikrobiyolojik Analizin Temelleri

Analiz yöntemi, asıl olarak numunede beklenen ya da izin verilen sayıya göre belirlenir. Bu belirlemede, “analizin duyarlılığı” belirleyici faktördür. Katı besiyeri kullanılan yayma ve dökme kültürel sayımlarda eğer sayım yapılacaksa Petri kutusunda ideal olarak 100 koloni oluşması beklenir.

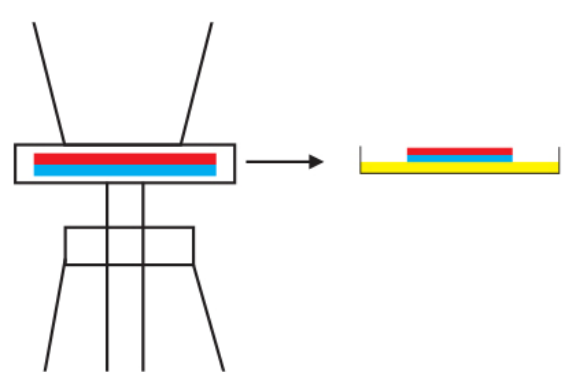
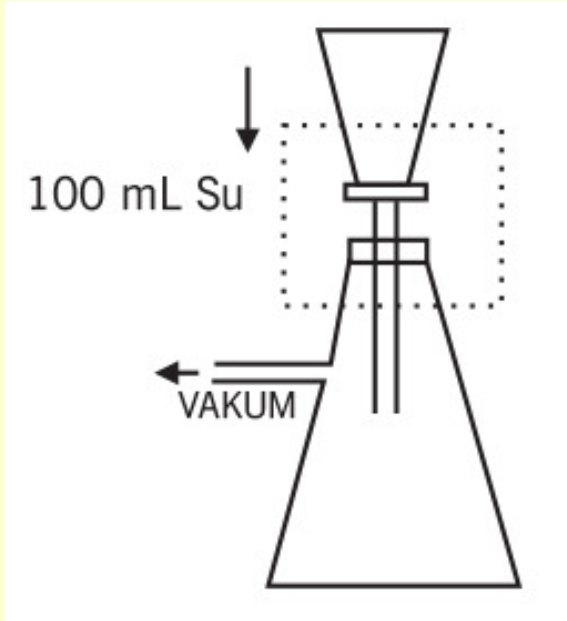
Gıdalarda temel mikrobiyolojik analiz, yayma kültürel sayım (yayma plak) yöntemidir. Sıvı gıdanın kendisinden ekim yapıldığında inkübasyon sonunda 100 koloni meydana gelirse numunede 1.000 KOB/mL sonucuna varılır.

# 01c Mikrobiyolojik Analizin Temelleri

İçme-kullanma suları örneğinde olduğu gibi 100/250 mL su numunesi kullanılacak analizlerde EMS yöntemi, teorik olarak kullanılabilse de bu yöntem pratik uygulamada geçerli değildir. 100/250 mL su numunesi kullanılacak analizlerde Membran Filtrasyon yöntemi en makul analiz şeklidir.

Ayrıca ulusal (TS EN ISO 622)/ uluslararası kurallar içme-kullanma sularında 22 ve 36 °C'ta gelişebilen mikroorganizmaların dışında tüm analizlerin membran filtrasyon ile analiz edilmesini hükme bağlamıştır.

# 02a Membran Filtrasyon



**Temel prensip: Mikroorganizmanın geçemeyeceği kadar küçük gözenekleri olan filtreden analizi yapılacak numune geçirilir ve filtre uygun bir katı besiyerine yerleştirilerek inkübasyona bırakılır. Filtrede tutulmuş olan hücreler besiyerinden gerekli besinleri emerek gelişir ve filtre üzerinde standart koloniler oluştururlar. Gözenek (por) büyüklüğü bakteri analizlerinde genel olarak  $0,45 \mu\text{m}$ ; maya küf analizlerinde  $0,80 \mu\text{m}$ 'dir.**

## 02b Membran Filtrasyon

Gıda (ve su) analizleri dışında, sıvıların ve gazların sterilizasyonu ile proses ve kullanılan membranın gözenek boyutuna göre; ters ozmoz, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon gibi uygulamalarda da kullanılır. Klinik ve endüstriyel alanda başka uygulamaları da vardır.

Sadece membrandan kolaylıkla geçecek, membranı tıkamayacak sıvı gıdaların mikrobiyolojik analizi için uygundur: İçme/ kullanma suları, maden suları, partikül içermeyen her türlü meşrubat, bira ve şarap, berrak meyve suları analizinde membran filtrasyon başarı ile kullanılabilir.

## 02c Membran Filtrasyon

Yağlı içme sütündeki yağ, membranı tıkar. Salça ve kayısı suyu gibi pulplu gıdalar filtre edilemez. Ön filtrasyon ile 0,45 µm porlu asıl filtreyi tıkayacak partiküllerin tutulması ve sonra 2 filtrenin ayrı ayrı olarak besiyerinde inkübe edilmesi teorik olarak geçerlidir ama her zaman başarı elde edilemez.

Sellüloz enzimi ile pulplu meyve suyu gibi örneklerde pulpu oluşturan ana materyal olan selülozun parçalanması ve sonra 0,45 µm porlu filtre kullanılması laboratuvar koşullarında gösterilmiştir ancak güncel uygulamada geçerli değildir.

## 02d Membran Filtrasyon

Benzer uygulama proteaz enzimleri ile de yapılmıştır.

-Laboratuvardaki her başarılı analiz, günlük analizlere taşınamaz, maliyet unsuru vardır. Ayrıca enzimin bekleme süresi içinde eğer varsa numunedeki hedef mikroorganizma sayısı artar.

-Pulplu meyve suyu, salça, yoğurt gibi gıdaların membran filtrasyon ile analizine gerek yoktur. Bu gibi gıdaların mikrobiyolojik analizi dökme plak, EMS ya da biyolojik stabilite testleri ile yapılır.



# 02e Membran Filtrasyon

Bugün için gıda sanayisinde membran filtrasyon sisteminin en yaygın kullanıldığı alanlar; insani tüketim amaçlı sular, maden suları, partikül içermeyen her türlü meşrubat, bira ve şaraptır.

İnsani tüketim amaçlı sular ile kasıt, kaynaktan başlayıp son ürüne kadar giden farklı noktalardan örnek alınmasıdır. Buna, belediyeler tarafından arıtılan şebeke suyu dahildir.

Membran filtrasyon, gıda sanayisinde mikrobiyel indirgeme ve laboratuvar analizlerinde kullanılır.

## 02f Membran Filtrasyon

**Bu sistem, ağırlıklı olarak içme sularının bir anlamda üretiminde dolum öncesinde tam bir sterilizasyon amacıyla kullanılır. Dikkat edilmesi gereken husus doğru filtrenin kullanılmasıdır.**

**Devamında; insani tüketim amaçlı sular, maden suları, meşrubat ile alkollü içeceklerin (bira ve şarap) günlük laboratuvar analizlerinde kalite kontrol amacıyla kullanılmaktadır. Meşrubat, bira ve şarapta yasal bir denetim yoktur, işletmeler kendi kalite standartları çerçevesinde ürünlerini bu yöntemle kontrol ederler.**

# 03a 07 03 2013 Tarihli Yönetmelik

T. C. Sağlık Bakanlığı tarafından 17 Şubat 2005 tarih ve 25730 sayılı Resmî Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelikte 1. Değişiklik 24.07.2005/ 25885/ Madde 36c, Ek 1 Not 2, Ek 2 Tablo A, Ek 3 ve 2. Değişiklik 15.09.2006/ 26290/ Madde 49'da yapılmıştır. Asıl değişiklik 07 Mart 2013 tarihli Resmî Gazetede yayımlanan yönetmelik ile yapılmıştır. Basit olarak mikrobiyolojik analizleri ilgilendirmek üzere; Koliform ve Clostridia grupta önemli değişiklikler olmuştur.

## 04a Koliform analizi

Standarda göre kullanılan besiyeri Lactose TTC Agar with Tergitol'dür. Farklı markalarda farklı isimle pazarlanır. Bu besiyerinde bütün koliform grup bakteriler aynı morfolojide koloni oluştururlar. Koloni rengine kıyasla filtre altındaki sarı benek görülmesi daha önemlidir. Oksidaz testi de yapılmalıdır.

Zayıf selektiviteli bir besiyeridir. Bu nedenle içme ve kullanma suyu gibi temiz suların analizi için uygundur.

Fekal koliform analizinde kullanılan mFC besiyeri fekal koliformlar için selektif değildir. Selektivite 44,5 °C'ta yapılan inkübasyon ile sağlanır.

## 04b Koliform/ *E. coli* (?) analizi

Yeni yönetmelikte, *E. coli* analizinde MUG ve indol testi ile doğrulama getirilmiştir. Şüpheli koloni Fluorocult LST Broth besiyerine aktarılıp 37 °C'ta 24±4 saat inkübasyon sonunda floresan (MUG) ve devamında indol testi yapılabilir.

-Floresan testinde aşırı asit oluşumuna bağlı maskeleyemeye dikkat edilmelidir. Şüpheli durumda Fluorocult LST Broth besiyerine 1 N NaOH çözeltisinden 1 mL eklenip yeniden floresan testi yapılmalıdır.

-Eklenen bu NaOH, izleyen indol testini etkilemez.

## 04c Koliform/ *E. coli* (?) analizi

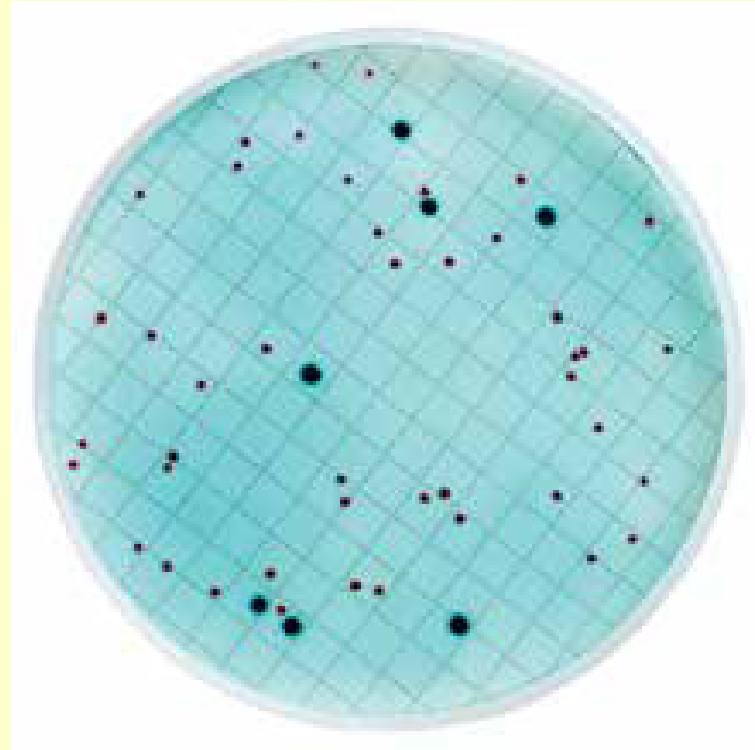
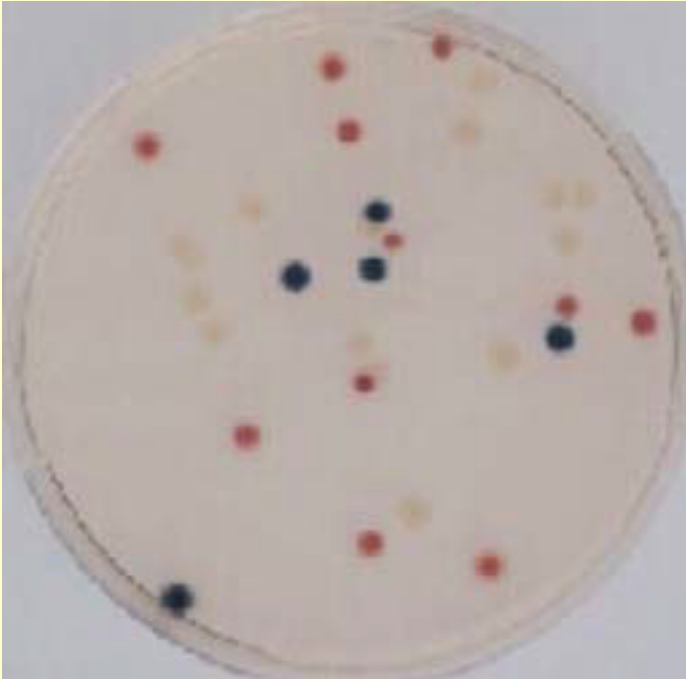
Standart LST Broth besiyerinde triptofan yoktur. Dolayısı ile bu besiyerinde indol testi yapılırsa sonuç her koşulda negatif çıkacaktır. MUG ve indol testi konusunda dikkatli olunması gerekiyor. Besiyeri/ kit bileşimine dikkat edilmelidir.

Bactident *E. coli* ile en geç 3-4 saatte MUG ve indol testi yapılabilir. ReadyCult Coliforms da kullanılabilir.

Koliform grup bakterisi olduğu bilinen izolat için MUG negatif ama indol pozitif sonuç alınırsa **kırmızı alarm**: EHEC *E. coli* O157:H7 serotipi yakalanmış olabilir.

# 04d Koliform/ *E. coli* analizi

*E. coli* dışındaki diğer Koliform grup bakteriler ile *E. coli*, kromojenik besiyerlerinde ayrı ayrı sayılabilir.



## 05 *Pseudomonas* analizi

*Pseudomonas* ile asıl olarak *Ps. aeruginosa* kastedilir. Ceftrimide ve diğer *Pseudomonas* selektif besiyerlerinde *Ps. fluorescens* de aynı morfolojide koloni oluşturur ve UV lamba ile floresan ışımaya verir.

Bu 2 bakterinin ayrımı asetamid testi ile yapılır. Asetamid testinde *Ps. aeruginosa* pozitif, *Ps. fluorescens* negatif sonuç verir. Pratik uygulamada 42 °C'ta gelişme testi de uygulanabilir. CASO Broth ya da CASO Agar gibi genel içerikli bir besiyerinde 42 °C'ta 24 saat inkübasyonda *Ps. aeruginosa* gelişebilir ama *Ps. fluorescens* gelişemez.



## 06 Enterokok analizi

Filtrasyon sonrasında membran filtre “Membran-filter Enterococcus Selective Agar acc. to Slanetz and Bartley besiyerine yerleştirilip  $36 \pm 2$  °C’ta  $44 \pm 4$  saat inkübe edilir. Tipik ya da şüpheli koloniler varsa doğrulama yapılmalıdır.

Filtre, ters çevrilmeden  $44 \pm 1$  °C’a ısıtılmış Bile Aesculin Azide Agar üzerine yerleştirilir. Petri kutusu  $44 \pm 0,5$  °C’ta 2 sat inkübe edilir. Enterokoklar eskulini hidrolize ederek glikoz ve eskuletine parçalar. Eskuletin, demir (3) iyonları ile kompleks oluşturur. 2 saatlik inkübasyon sonunda koloni çevresinde açık renkten siyaha kadar değişen zon oluşumu enterokoku doğrular.

## 07 Staphylococcus analizi

*Staphylococcus* ile koagülaz pozitif *Staph. aureus* kastedilmektedir. Baird-Parker Agar besiyerinde kolaylıkla belirlenebilir. Arıtılmış içme sularında bulunması beklenmez. Asıl olarak yüzme havuzlarında yüzücülerden kaynaklanan bulaşma söz konusu olabilir.

Baird-Parker Agar üzerinde saydam zon yapan siyah renkli parlak koloniler *Staph. aureus* olarak tanımlansa bile yeterli değildir.

Her koşulda koagülaz testi yapılarak patojen olup olmadığı saptanmalıdır.

## 08 *Clostridium* analizi

*Clostridium* spor analizinde 0,2 µm porlu membran filtreler kullanılır. Spor analizinde pastörizasyon gereklidir.

Bu amaçla numune  $75 \pm 5$  °C'ta 15 dakika tutularak vejetatif hücrelerin ölmesi sağlanır. Pastörize edilip soğutulmuş numune filtre edilir.

Pastörizasyon sırasında spor oluşumu tamamlanmış hücreler canlı kalır.

# 09 Petri kutularının inkübasyonu

Pek çok kaynakta Petri kutusuna yerleştirilen membran filtrenin düşme olasılığına karşı tabanı üzerinde inkübasyon önerilir.

EPA (US Environmental Protection Agency) ise Petri kutularının kapağı üzerinde inkübasyonunu önermektedir. Filtre, kapağa düşecek olursa koloni gelişmesi olmayacağı açıktır.

Tabanı üzerinde inkübasyonun sakıncası ise su damlaların besiyeri/ filtre üzerine düşerek kolonilerde aşırı gelişmedir.

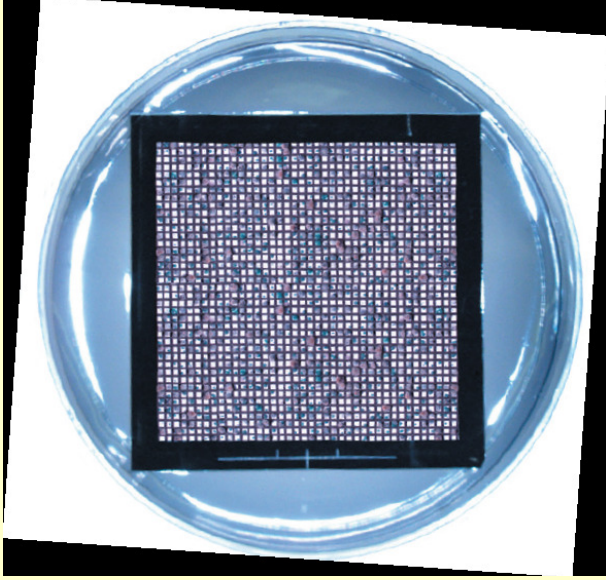
# 10a HGMF



Hydrophobic Grid Membrane Filter; ABD'de kullanılan özel bir membran filtrasyon sistemidir. 40x40 olmak üzere filtrasyon alanı 1600 kareden oluşur. Karelerin sınırında hidrofobik bir ızgara sistemi vardır.

Filtrasyon sonunda hücre ızgara üzerinde kalmaz, her koşulda ya alttaki ya üstteki ya sağdaki ya da soldaki kareye geçer ve burada koloni oluşturur. İnkübasyon sonunda koloniler değil, pozitif kareler sayılır ve sonuç, özel bir formül ile hesaplanarak EMS olarak verilir.

# 10b HGMF



HGMF + YM11 Agar besiyeri ile 48 saat sonunda küf sayımı yapılabilir. Prensibi, küf kolonileri henüz çıplak gözle fark edilemeyecek kadar küçük olmasına rağmen metabolitlerin besiyerindeki bir indikatör aracılığı ile renk değişimi sağlamasıdır.

1600 karenin her birinin alanı yaklaşık  $1,5 \text{ mm}^2$  olup, metabolitler 48 saatlik inkübasyon sonunda bu alanda fark edilebilir renk değişikliği yapar. Tek başına YM11 Agar 48 saatte küf sayısını veremez.

# 11a Besiyerleri

Membran filtrasyon sisteminde kullanılan çok farklı yaklaşımlarla hazırlanmış besiyerleri vardır. Koloni elde edilmesi esas olduğuna göre katı besiyeri kullanılması gerekir. 3 ana grup vardır.

-Filtre, önceden agarlı besiyeri dökülmüş Petri kutusu üzerine yerleştirilir. Bu besiyerleri, laboratuvarda hazırlanabileceği gibi hazır ticari formda da sağlanabilir.

-Filtre, absorban pede besiyeri eklenmiş, kurutulmuş ve kullanma anında steril su ile ıslatılarak aktive edilen besiyeri üzerine yerleştirilir. 3M Petrifilm vb. kullanıma yarı hazır besiyerleri de bu amaçla kullanılmaktadır.

# 11b Besiyerleri

-Filtre, bir Petri kutusu içinde absorban pet bulunan ve kullanım anında steril sıvı besiyeri dökülerek aktive edilen besiyeri üzerine yerleştirilir. Bu besiyerleri, hazır ticari formda sağlanabileceği gibi steril boş Petri kutusu içinde steril pet sağlanarak laboratuvar da hazırlanabilir.

Bu 3 ana gruptan hangisinin seçileceği laboratuvarın kararıdır. Bu amaçla üretilmiş yerli ya da yabancı pek çok marka bulunmaktadır. Kaliteye dikkat edilmesi önceliklidir. Düşük fiyat, ucuz anlamına gelmez.



***Teşekkürler,***

***Sorularınız/ katkılarınız***

***Prof. Dr. A Kadir Halkman***  
***Ankara Üniv. Gıda Mühendisliği Bölümü***