

GIDA MİKROBİYOLOJİSİ

UYGULAMA DERS NOTLARI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. Genel Bilgi

1.1. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvar Kuralları

1.2 Laboratuvar Dizaynı

1.3. Besiyeri Hazırlanması ve Depolanması

1.4. Sterilizasyon

1.4.1. Isıl İşlem İle Sterilizasyon

1.4.2. Filtre ile Sterilizasyon

1.4.3. Kimyasal Madde ile Sterilizasyon

1.4.4. Işınlama ile Sterilizasyon

1.5. Ekim Öncesi İşlemler

1.5.1. Örnek Alma

1.5.2. Homojenizasyon ve Seyreltme

1.6. Ekim ve Sonrası İşlemler

1.6.1. Ekim

1.6.2. İnkübasyon

1.6.3. Sayım

1.7. Mikroorganizma Sayım ve Tespitinde Temel Yöntemler

1.7.1. Katı Besiyerinde Sayım Yöntemleri

1.7.2. En Muhtemel Sayı Yöntemi

1.7.3. Membran Filtrasyon Yöntemi

1.7.4. Titre Belirlenmesi

1.7.5. Metabolizmaya Dayalı Hızlı Analizler

1.7.6. Canlandırma

1.7.7. Var/ yok Testleri

1.7.8. Biyolojik Stabilitate Testi

1.8. Kullanılmış Malzemenin Yıkınması

2. Önemli Mikroorganizmaların Analiz Yöntemleri

2.1. Koliform Bakteri Sayımı

2.1.1. EMS Yöntemi ile Sayım

2.1.2. Katı Besiyerinde Sayım

2.2. Fekal Koliform Bakteri Sayımı (EMS Yöntemi)

2.3. *E. coli* Sayımı

2.3.1. Klasik EMS Yöntemi ile Sayım

2.3.2. EMS Yöntemi ile Hızlı Sayım (MUG Tekniği)

2.3.3. Katı Besiyerinde Sayım

2.4. Toplam Enterobacteriaceae Sayımı

2.5. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı

2.6. Toplam Psikrofilik Bakteri Sayımı

2.7. Toplam Termofilik Bakteri Sayımı

2.8. Toplam Sporlu Bakteri Sayımı

2.9. Toplam Halofil Bakteri Sayımı

2.10. Maya–Küf Sayımı

2.11. Ozmofilik–Ozmotolerant Maya Sayımı (EMS Yöntemi)

2.12. *Staphylococcus aureus* Sayımı

2.13. Lipolitik Bakteri Sayım

2.14. Proteolitik Bakteri Sayım

2.15. Rope Sporu Sayımı (EMS Yöntemi)

2.16. Ekşime Yapan Sporlu Bakteri Sayımı

3. Yaygın Kullanılan Çözelti ve Besiyerlerinin Bileşimi

3.1. Seyreltme Çözeltileri

3.1.1. Steril Fizyolojik Su

3.1.2. % 0.1 Peptonlu Su

3.1.3. Maximum Recovery Diluent (Peptonlu Fizyolojik Su)

3.1.4. Ringer Çözeltisi (1/4)

3.1.5. % 20 Glikoz Çözeltisi

3.1.6. % 2 Sodyum Sitrat Çözeltisi

3.1.7. Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi

3.2. Ayıraçlar

3.2.1. Kovacs

3.2.2. α -Naftol

3.2.3. Metil Kırmızısı

3.3. Boyalar

3.3.1. Metilen Mavisi (Ölü-Canlı maya sayımı için)

3.3.2. Kristal Viyole

3.3.3. Karbol Fuksin (Asit-Fast Boyama İçin)

3.3.4. Sulu Fuksin (Gram ve Basit Boyama İçin)

3.3.5. Gram İyot Çözeltisi

3.3.6. Laktofenol Pikrik Asit Çözeltisi

3.4. Besiyerleri

3.4.1. Bromcresol Purple Dextrose Broth (BCP)

3.4.2. EC Broth

3.4.3. MR-VP Besiyeri

3.4.4. Glikoz Tripton BCP Broth ve Agar

3.4.5. Sülfite Agar

3.4.6. Skim Milk ; Yağsız Süt

3.4.7. Tryptone Water

3.4.8. Peptone Water

3.4.9. Ozmofil Maya Besiyeri

3.4.10. Ozmotolerant Maya Besiyeri

1.Bölüm

Genel Bilgi

Gıdaların büyük çoğunluğu çok çeşitli mikroorganizma gruplarının çoğalması için uygun ortamlardır. Bu mikroorganizmalardan büyük kısmı gıdalarda tat, koku ve renk gibi duyuşsal niteliklerde bozulmaya neden olarak onları tüketici tarafından istenilmeyecek duruma getirirken; patojenler ise gıda zehirlenmeleri ve infeksiyonlarına neden olarak halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturabilmektedir. Gıdalarda gerçekleştirilen mikrobiyal analizlerin temel iki esası; bozulma ve sağlık riskleri açısından gıdanın potansiyel durumunu ortaya çıkarmak ile starter kültür üretimi ve aktivitesinin belirlenmesidir.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı; gıdanın kendisi, üretimi, taşınması ve depolanmasında kullanılan alet-ekipmanlar, üretildiği veya depolandığı tesislerin atmosferi, çalışan personel ile analizlerin yapılacağı laboratuvarın atmosferi ve ekipmanlarında bulunabilecek mikroorganizmaların arandığı veya sayıldığı bir laboratuvardır.

Gıda maddelerinin çok büyük kısmı çok farklı sayıda ve türde mikroorganizmalar içermektedir. Bu mikroorganizmalardan bir kısmı bulunduğu gıdanın üretiminde mutlak gerekli olmaktadır. Bu tip gıda maddeleri **fermente gıdalar** olarak isimlendirilmektedir. Diğer gıda maddelerinde ise mikroorganizmaların bulunması gerekli değildir, hatta istenmez. Ancak, steril gıda üretmek pek çok gıda maddesinin üretim teknolojisi yönünden mümkün değildir. Bu nedenle gıda maddelerinde doğal olarak bulunabilen, patojen olmayan ve üretim tekniği ile elemine edilemeyen bir grup mikroorganizmanın belirli sayıda bulunmasına izin verilmektedir. Bununla birlikte hiçbir gıda maddesinde patojen mikroorganizma bulunmasına müsaade edilmez. Bu nedenle gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında yapılan çalışmaların temel amacı: çok farklı cins ve türlere ait olan mikroorganizma gruplarının varlığını veya sayısını belirleyerek, yürürlükteki tüzük ve standartlara veya ticarete alıcı kuruluşun belirlediği standartlara uygun olup olmadığını belirlemektir.

1.1. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvar Kuralları

Bir mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan personelin uyması gerekli kurallar şunlardır:

- Mikrobiyoloji laboratuvarında mutlaka mikrobiyoloji eğitimi almış personel çalışmalıdır.
- Laboratuvarda çalışırken temiz bir önlük giyilmeli, laboratuvarda kullanılan önlük ile laboratuvar dışına çıkılmamalıdır. Kullanılan önlüğün diz kapağını örtecek uzunlukta olmasına dikkat edilmelidir.
- Personel kişisel temizliğine dikkat etmelidir. Tırnaklar kısa kesilmeli, saçlar bone ile kapatılmalıdır. Grip, nezle benzeri hastalıklara yakalanmış personele izin verilmeli veya ellerinde kesik/iltihabi yara bulunan personeller gibi özel koruma/korunma önlemleri alarak çalışmalıdır.
- Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarına yetkili kişiler dışında hiç kimse girmemelidir.
- Laboratuvarda hiçbir şey yenilmemeli, içilmemeli ve analiz örnekleri dışında gıda maddesi bulundurulmamalıdır.

- Çanta, palto vs. kişisel eşyalar laboratuvar dışında bırakılmalıdır. Laboratuvar hijyeni açısından gereksiz hiçbir maddenin laboratuvarda bulunmasına izin verilmemelidir.
- Laboratuvarda hava cereyanı olması ekimlerde kontaminasyona neden olur. Bu nedenle özellikle ekim aşamasında laboratuvarda hava akımı olmamasına dikkat edilmelidir.
- Çamurlu ayakkabılarla laboratuvara girilmemelidir. Çünkü toz kontaminasyonda en önemli kaynaklardan birisidir.
- Sabah işe başlamadan ve akşam iş bitiminde tezgahlar dezenfekte edilmelidir. Personel her giriş ve çıkışta ellerini dezenfekte etmelidir.
- Laboratuvar çöp sepetleri içinde otoklavlanabilir poşet bulunmalı, çöpler otoklavlandıktan sonra atılmalıdır.
- Mikroorganizma üremiş materyalin kırılması, yere dökülmesi halinde gereken karantina ve dezenfeksiyon uygulanmalıdır.

1.2. Laboratuvar Dizaynı

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı dizayn edilirken en az 3 temel bölüm halinde yapılmasına dikkat edilmelidir. Bunlar; otoklav ve yıkama odası, numune ön hazırlık ve inkübasyon odası ile ekim odası olmalıdır.

İkinci dikkat edilecek nokta ise starter kültür hazırlama ile mikrobiyolojik analizlerin kesinlikle aynı laboratuvarda gerçekleştirilmemesidir. Starter üretim bölümü fiziki olarak ve personel olarak ayrı bir birim olmalıdır.

Bina inşa edilirken dikkat edilmesi gerekli noktalar ise şöyle özetlenebilir:

- Zemin duvar ve çalışma tezgahları düzgün yüzeyli, kullanılacak temizlik ve dezenfeksiyon maddelerinden etkilenmeyecek nitelikte olmalıdır. Mikroorganizma barındırmayan malzeme seçimine dikkat edilmelidir.
- Laboratuvar dizaynı temizlik yapılmasına imkan verecek şekilde olmalıdır. laboratuvarda bulunan dolaplar üzerinde toz birikmemesi için tavana kadar devam etmelidir. Dolap ve tezgahların alt kısımları ise ya zemin ile bitişik olmalı altına kirlilik etmenleri girmemeli, veya en az 20 cm yüksekten itibaren başlamalı böylece temizliğe uygun olmalıdır.
- Laboratuvarda yeteri kadar elektrik prizi, su musluğu, evye, havagazı musluğu olmalıdır. Güvenlik açısından gerektiği zaman bunları kolayca kapatılabilecek şekilde emniyet önlemleri alınmış olmalıdır.
- Laboratuvara direk güneş ışığının ve girmesinden kaçınılmalı, havalandırma pencereler vasıtası ile yapılmamalıdır.

1.3. Besiyeri Hazırlanması ve Depolanması

Mikroorganizmaların üretilmesi, canlılıklarının devam ettirilmesi, saf kültürlerinin eldesi, makroskopik morfolojilerinin ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, metabolik ürünlerinin elde edilmesi v.b. amaçlarla çoğaltmak için için kullanılan uygun bileşimdeki besin öğelerini içeren ortama besiyeri denilmektedir. Besiyerleri kullanım amacına göre Zenginleştirme, Genel Amaçlı, Seçici, Diferansiyel, Spor ve Depolama Besiyeri olarak sınıflanmaktadır.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında kullanılacak besiyerleri ticari firmalar tarafından toz veya granüler halde hazırlanarak piyasaya sunulurlar. Tartım sırasında oluşan tozuşmadan kaçınmak için granüler halde olanların tercih edilmesi uygun olacaktır. Bazı laboratuvarlarda besiyerleri bileşenleri ayrı ayrı tartılarak hazırlanmaktadır. Hem tartımdaki hatalardan kaçınmak hem de zaman kazanmak açısından eğer zorunluluk yok ise bundan kaçınmak hazır karışım halindeki besiyerlerini kullanmak gerekir. Besiyerlerinin ve çözeltilerin hazırlanmasında dikkat edilecek hususlar, görülebilecek hatalar ve nedenleri aşağıdadır:

- Besiyeri hazır karışım halinde ise ambalaj üzerinde belirtilen miktar hazırlanacak hacme göre hesaplanarak tartılır. Tartım doğrudan besiyeri hazırlanacak kaba veya özel tartım kaplarına yapılabilir. Prensip olarak 0,01 g hassasiyette terazi kullanımı yeterlidir. Tartımda temiz bir spatül kullanılmalı, tozuşmadan kaçınılmalı ve tartım sonrası besiyeri kapları çok iyi bir şekilde kapatılmalıdır.
- Besiyeri hazırlamada kullanılacak kabın (erlen veya balonun) hacmi uygun seçilmelidir. Besiyerinin hacmi, hazırlama kabının hacminin 2/3'ünden az olmalıdır. Tartılan besiyerinin konulduğu kabın ağzına yapışmaması için gerekli önlemler alınmalıdır. Örneğin kap kuru olmalıdır.
- Tartımı yapılmış dehidre besiyeri üzerine gerekli suyun önce az bir kısmı konulması bulamaç haline getirdikten sonra geri kalan kısmın ilavesi eritme işleminde kolaylık sağlamaktadır. Bu şekilde hazırlanmış besiyerleri eğer tüplere veya balonlara dağıtılacak ise erime tamamen sağlanmalı dağıtım daha sonra gerçekleştirilmelidir. Su ilave edilmiş besiyerinin diğer işlemlere geçmeden önce homojen karışımın ve erimenin sağlanması için oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmesi önerilir.
- Agarlı besiyerleri mutlaka kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında eritildikten sonra otoklavlanmalıdır. Ancak, besiyeri hazırlanmasında otoklav kullanılmıyor ise ilgili besiyerinin hazırlanması ile ilgili talimata uyulmalıdır.
- Besiyeri pH değeri kontrol edilmeli ve ayarlanmalıdır. Ancak otoklavlama sonrası pH değerinde 0,1-0,2 arasında, bazen 0,4 pH değerine kadar düşme olabilir. Bileşiminde fosfat tamponu olan besiyerlerinde önemli değişiklik olmaz. Bu nedenle tampon içermeyen besiyerlerinin pH ayarlaması otoklavlamadan sonra uygun yöntem ile yapılabilir.
- Otoklav sterilizasyon normu olarak üretici firma tarafından verilen bilgilere uyulmalıdır. Genel olarak dikkat edilmesi gereken kural besiyerine en az zararı verecek şekilde tüm mikroorganizmaları öldürmektir. Bunun için de belirlenmiş norm 121°C'de 15 dakika olarak kabul edilir. Ancak bu sürenin hacme de bağlı olacağı unutulmamalıdır. 250 ml'ye kadar olan hacimler için verilen bu süre, besiyeri miktarının 1000 ml olması durumunda 20-25 dakikaya, 2000 ml olması durumunda 30-35 dakikaya uzatılmalıdır. En iyisi besiyeri 250 ml 'den fazla hacimde hazırlanmamalıdır.
- Besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanmasında ideal olarak cam ekipmanla distile edilmiş su kullanılmalıdır. Çeşme suyu veya bakır kaplarda elde edilmiş distile su uygun değildir.
- Sulandırılmış dehidre besiyerleri mikrobiyal gelişim olabileceği göz önüne alınarak vakit geçirilmeden sterilize edilmelidir.
- Otoklav sonrası katkı ilave edilecek ise besiyerinin 45-50°C kadar soğutulması gerekir. Agarlı besiyeri ise hızlı ön soğutmadan sonra yaklaşık 50°C 'da soğuduğunda 45°C 'daki su banyosuna alınması jelleşme ve bundan dolayı karıştırma ve dökme hatalarının meydana gelmemesi için uygun olacaktır. Yine katkı maddesi de katımdan önce oda sıcaklığına getirilmelidir. Karıştırma işleminin anafor olacak düzeyde yüksek devirde yapılmamasına

özen gösterilmelidir. Aksi halde oluşacak hava kabarcıkları da Petri kutusuna geçer ve daha sonra yapılacak çalışmaları zorlaştırır.

- Erlen veya balonlarda hazırlanmış gerekli ise katkı maddesi ilavesi yapılmış besiyerleri 50°C'ye soğutulduktan sonra petri kutularına ~15'er ml olacak şekilde dökülmelidir. Dökme kültür yöntemi ile sayım yapılacaksa bu durumda 45°C'ye soğutulmalıdır. Yüksek sıcaklıkta dökme durumunda kapakta su zerrelere oluşumu ve dökme ekimde de termal şoklar meydana gelir.
- Besiyerleri hemen o gün kullanılacaksa steril kabinler içerisinde petri kutusunun kapağı alta gelecek ve çok az açık olacak şekilde kurutulmalıdır. 37°C'de 10-15 dakika kurutma yeterli olabilir. Veya kapalı olarak oda sıcaklığında 1 gece bekletme ile de kurutma temin edilebilir.
- Otoklavda sterilize edilmiş agarlı besiyerlerinin jelleştikten sonra tekrar eritilmesi ile besiyeri performansında azalma olacağı unutulmamalıdır. Bu performans kaybı besiyerinin bileşimi ile doğru orantılıdır. Yine hazırlanmış besiyerinin 50°C'de 3 saatten fazla bekletilmesi de aynı sonuca neden olur. Genel olarak Plate Count Agar gibi basit bileşimli besiyerleri daha az zarar görür. Otoklavlanmadan ve sadece ısıtılarak sterilize edilen besiyerleri (örneğin Rambach Agar) tekrar eritilmez. Besiyerine katkı ilave edildi ise tekrar eritilmez.
- Laboratuvarda hazırlanmış tüm besiyeri ve çözeltilerin kapları üzerinde ne olduğu, hazırlandığı tarih ve hazırlayan kişi ismi yazılmalıdır.
- Sterilize edilmiş besiyeri ve çözeltilerin kontamine edilmemesine özen gösterilmeli, kuşku duyulursa bu çözelti asla kullanılmamalıdır.
- Hazırlanmış besiyerlerinin depolanması sözkonusu ise, ışık almayacak ve nem kaybetmeyecek şekilde depolanmalıdır. Petri kutusuna dökülmüş olan agarlı besiyerleri aksine bir uyarı yoksa 2-8°C arasında 2 haftaya kadar (Hazır dökülmüş besiyerleri 6 haftaya kadar) saklanabilir. Ancak; bazı besiyerlerinin hazırlandığı gün kullanılma zorunluluğu olduğu unutulmamalıdır. Besiyerleri asla dondurulmamalı ve yüksek sıcaklıktada saklanmamalıdır.
- Kontaminasyon, kuruma, renksizleşme, çatlama ve diğer bozulma işaretleri görülen plaklar asla kullanılmamalıdır.
- Dehidre edilmemiş besiyerlerinin saklanması ise kutusu üzerinde belirtilen depolama koşullarına uyulmalıdır. Genel olarak dehidre besiyerleri oda sıcaklığında (tercihan <25°C) kuru ve karanlık yerde, katkılar buzdolabı sıcaklığında depolanır. Dehidre besiyerlerinin nem almaması için açıldıktan sonra ağzı sıkıca kapatılmalıdır. Son kullanma tarihinin kutu kapağı hiç açılmamış olmak kaydı ile geçerli olduğu ve açılmış kutuların 1 yıldan daha fazla depolanmaması gerektiği unutulmamalıdır.

Besiyerlerinde Görülebilecek Hatalar ve Başlıca Nedenleri

Problemler	A	B	C	D	E	F	Diğer Nedenler
Anormal Renk	*	*					
Yanlış pH	*	*	*	*	*		Yüksek depolama sıcaklığı, İngredientlerin hidrolizi, Hatalı sıcaklıkta pH ölçümü
Atipik Çökelti	*	*	*	*			
Tam Çözünmeme				*			Yetersiz ısıtma, Çok küçük erlenlerde yetersiz ısı yayılımı
Karamelizasyon ve Koyu renk	*		*	*			

Toksitite		*					Yanma, kavrulma
İz Bileşenler		*					Hava veya çevresel kaynaklar
Jelleşme yeteneği kaybı			*	*		*	pH değiştirme nedeni ile agarın hidrolizi, Besiyerinin kaynatılmaması
Besin öğeleri kaybı, seçici ve ayırteci özellikte kayıp	*		*	*	*	*	Yanma-kavrulma, güçlü elektrolitlerin varlığı, şeker çözeltileri, deterjanlar, antiseptikler, ağır metaller, inokulumu inhibe edebilecek protein tabiatında maddeler ve diğer bileşenler
Kontaminasyon	*	*					Hatalı sterilizasyon, hatalı katkı ilavesi ve plaklara dökme tekniği, agar içeren besiyerini kaynatmama

A: Bozuk Besiyeri **B:** Hatalı Yıkanmış Cam Malzeme **C:** Hatalı Tartım
D: Tam Çözünmeme **E:** Tekrar Eritme **F:** Yüksek miktarda inokulasyon ile seyrelme

1.4. Sterilizasyon

İstenilen mikroorganizma ile ekim yapmadan önce, mikrobiyolojik ortam ve onunla temasta bulunan tüm materyaller sterilize edilmelidir. Sterilizasyon, sporların da dahil olduğu tüm mikroorganizmaların tamamıyla öldürülmesini sağlamaktadır. Sterilizasyon ısı işlem, kimyasal maddeler, ışınlama ve filtrasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Hangi yöntem ile sterilize edilirse edilsin malzemenin sterilize olup olmadığının veya bir başka ifade ile sterilizasyonun kontrolü gereklidir. Sterilizasyon yöntemi bakteriyolojik, kimyasal indikatörlerin kullanıldığı yöntemler veya numune içine yerleştirilen termokupullar ile yapılabilir.

Sterilizasyon Metodu	Biyolojik İndikatör
Buhar	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Kuru Hava	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i>
Etilen Oksit	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>globigii</i>
Filtrasyon	<i>Pseudomonas diminuta</i>

1.4.1. Isıl İşleme Sterilizasyon

Mikroorganizmaların sıcaklığa dayanıklılıkları birbirinden büyük farklılıklar gösterir. Bu mikroorganizma türüne bağlı olduğu gibi, sıcaklığın kuru veya nemli oluşuna, mikroorganizmanın vejetatif veya spor formunda oluşuna, gelişme fazına ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Uygulanan ısı işlemi göre farklı kısımlara ayrılır:

Basınçlı Nemli Sıcaklıkta Sterilizasyon

Bakteriler kuru sıcak yerine daha çok nemli sıcaklık (buhar) kullanılarak öldürülür. Çünkü nemli sıcaklıkta hücre proteini koagülasyonu daha fazla olduğu için mikroorganizmaların ölümü de daha kolay olmaktadır. Kültür ortamlarının, sulu çözeltilerin ve atık kültürlerin sterilize edilmesinde kullanılır. Otoklavda kuru havanın ortamdaki atılmasıyla sterilizasyon için gerekli sıcaklığa ulaşılır ve yüksek basınç altında gerekli sürede (genellikle 121°C, 15 dak.) sterilizasyon gerçekleştirilir.

Besiyerlerinin ve çözeltilerin otoklav ile sterilizasyonunda dikkat edilecek hususlar:

- Besiyeri ve/veya çözelti vida kapaklı şişede hazırlanıyor ise kapak çok sıkı olarak kapatılmamalıdır. Aksi halde içeride kalacak hava ısıyı yeterli iletmeyeceği için besiyeri sterilize olmaz.

- Deney tüplerinde hazırlanmış besiyeri ve/veya çözeltiler cam behere konularak sterilize edilmemelidir. Cam beherde tüpler arasında sıkışan hava ısıyı iletmez. Tüpler ideal olarak tel sepette, yoksa tabandan delinmiş boş konserve kutularında sterilize edilmelidir.
- Deney tüpleri ve erlenmayerler en fazla 2/3 'üne kadar doldurulmalıdır.
- Doğru çalışmayan, geç ısınan otoklav kullanılmamalıdır. Otoklav etkinliği otoklav şeridi ile kontrol edilmelidir. Bu amaçla her otoklavlama sırasında farklı yerlere yerleştirilen en az 2 erlen ve/veya tüpe otoklav şeridi yapıştırılır. Otoklavlama sonrasında şerit rengi değişmiş olmalıdır.
- Sterilizasyon odası aşırı doldurulmamalıdır. Serbest buhar dolaşımı sağlanmalıdır.
- Otoklavlama işlemi tamamlandığında basınç yavaşça düşürülmeli ve vakit geçirilmeden otoklav açılarak besiyeri dışarı çıkartılmalıdır. Otoklavlanmış besiyeri uzun süre otoklavda tutulursa performans kaybı olabilir.
- Otoklavlama sırasında besiyeri kutusunda ve/veya ilgili talimatta yazılan sıcaklık–süre kuralına uyulmalıdır. Besiyeri kalın etli vida kapaklı cam şişede hazırlanıyorsa otoklavlama süresine 5 dakika ilave edilmelidir.
- Kullanılacak besiyerleri ile önceden kullanılmış ve yıkama öncesi sterilize edilecek besiyerleri aynı anda otoklavlanmaz.

Aşırı otoklavlama sonucu aşağıdaki problemler oluşur:

- Yanlış pH,
- Agarın jelleşme yeteneğinde düşüş,
- Tipik olmayan çökelti oluşumu,
- Besiyerinde karamelizasyon ve koyu renk oluşumu,
- Besin değerinde kayıp,
- Seçici veya ayırıcı özelliğinde kayıp.

Kuru Sıcaklıkta Sterilizasyon

Buhar tarafından korozyona uğrayan yada kullanılmadan önce kuru kalması gereken yüksek sıcaklıktan zarar görmeyen petri kutusu, pipet, steril boş erlen ve tüp gibi cam malzemeler, metal aletler, pamuklar 180°C 'da 1 saat ya da 160°C 'da 2 saat süre ile kuru hava sterilizatöründe sterilize edilir. Bu sıcaklıkların tercih edilmesinde esas alınan bazı toprak bakterilerinin sıcaklığa dayanıklı sporlarının 160°C'de 1.5 saat; 170°C'de ise 1 saatte öldürülebilmesidir.

Bir diğer uygulamada özenin bunsen alevinde kızarıncaya kadar ısıtılarak sterilize edilmesidir.

Kaynatarak Sterilizasyon

Otoklavda sterilize edilemeyen bazı besiyerleri su banyosunda 95°C sıcaklıkta veya su buharında 30 dakika tutularak sterilize edilir. Bazı besiyerlerine ise sadece agarın eriyeceği kadar ısıl işlem uygulanır. Diğer bazı besiyerleri de 60°C sıcaklıkta sterilize edilir. Bu amaçla sıcak su banyosu kullanılır. Sterilizasyonun güvenilirliği için besiyeri ile aynı miktar su içeren bir başka erlen içinde termometre bulunmalı ve sıcaklık kontrol edilmelidir. Sıcaklık istenilen değere ulaştığında birkaç dakika tutularak işlem tamamlanır. Ancak, ısıl işleme son derece duyarlı bu tip sıvı besiyerlerinin filtrasyon ile sterilize edilmesi daha uygundur.

Kaynatılarak ya da ısıtılarak sterilize edilen besiyerlerinde kullanılan erlenlerin daha önceden pamuklanarak kuru hava sterilizatöründe sterilize edilmesi kontaminasyonun önlenmesi için uygun olacaktır.

Tindalizasyon

Sterilize edilecek materyal otoklav sıcaklıklarından zarar görüyorsa tindalizasyon işlemi uygulanabilir. Bu amaçla besiyeri veya çözelti kaynar su banyosunda 80°C'da 1 dakika tutulup oda sıcaklığında 1 saat beklenir, sonra lethal sıcaklık derecesine sahip su banyosunda (80–98°C) 30 dakika tutulur ve oda sıcaklığında 8-24 saat bırakılır. Su banyosunda aynı sıcaklıkta tekrar 30 dakika tutulup oda sıcaklığında 8-24 saat bekletilir. Aynı işlem 1 kez daha uygulanarak tindalizasyon tamamlanır.

Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken en önemli faktörlerden birisi oda sıcaklığında bekletmenin 8 saatten kısa 24 saatten uzun olmamasıdır. Çünkü bu süre sporların çimlenmesi fakat vejetatif formların tekrar spor oluşturmaması için uygun uzunlukta olmalıdır.

1.4.2. Filtrasyon ile Sterilizasyon

Sıvı veya gazlar filtrasyon ile sterilize edilebilirler. Filtrasyon ile mikroorganizmalar öldürülmez sadece ortamdan uzaklaştırılırlar. Besiyerlerine ilave edilecek vitaminler, bazı şekerler ve diğer bazı katkı maddeleri ısı işlemi ile sterilize edilemez. Bunlar filtre ile sterilize edilir. Bu amaçla ticari olarak hazırlanmış steril tek kullanımlık filtreler ya da laboratuvarda ısı ile sterilize edilen tek veya çok kullanımlık filtreler kullanılır. Filtre ile sterilizasyonda dikkat edilmesi gereken husus çözeltinin aseptik şartlara dikkat edilerek mutlaka steril bir kaba filtre edilmesidir.

Bu işlemde kullanılan filtreler üç gruba ayrılır:

Derin Filtreler : Bu filtreler cam yünü yada pamuklu yün gibi lifli materyallerle paketlenmiş kolonlardır. Kıvrılan ve dönen lifler parçacıkları tutarak filtre gibi görev görürler. Sıvının akışına direnç gösterirler. Bu nedenle gazların sterilizasyonunda kullanılırlar.

Membran Filtreler: Parçacıkları dışarda tutarak filtrasyonu sağlar. Membranlardaki porların büyüklüğü ve elektrostatik çekim düzeyi filtrasyonun etki gücünü belirler. Mikrobiyolojide yaygın olarak kullanılan filtreler selüloz asetat yada selüloz nitrat filtrelerdir. Eleyicilik için gereken filtredeki gözenek büyüklüğü: maya için 0.45-1.2 µm, bakteri için 0.2 µm, virüsler ve mikoplazmalar için de 0.01-0.1 µm olarak verilir. Ancak genel laboratuvar uygulamalarında 0.45 µm porlu filtrelerin kullanılması yeterli kabul edilir.

Nükleopor Filtreler : Bu filtreler nükleer radyasyon ile muamele edilmiş ve asitle yakılarak dikey boşluklar oluşturulmuş ince polikarbonat filmlerden oluşur.

1.4.3. Kimyasal Maddeler ile Sterilizasyon

Isı ile tahrip olabilecek hassas ekipmanların ve elektrikli aletler ile laboratuvar zemini, tezgahları gibi kısımların sterilize edilmesinde kullanılır. Kullanılan kimyasalların toksik olması nedeniyle çok yaygın bir metot değildir. Standart laboratuvar uygulamasında sterilizasyon amacıyla en yaygın kullanılan kimyasal madde alkoldür. Drigalski spatülü %70 (v/v) alkolde tutularak sterilize edilir. Ambalajın açılması sırasında ya %70 (v/v) alkol ya da uygun bir dezenfektan kullanılır. Yine laboratuvarda zefiran ve civa klorür gibi dezenfektanlar da çeşitli amaçlarla kullanılırlar. Diğer alanlarda ise etilen oksit (gaz), formaldehit, beta-propilactone ve SO₂ gaz formunda; glutaraldehit, hidrojen peroksit, perasetik asit formaldehit sıvı formda en çok kullanılan kimyasallardır.

The gases include

En yaygın kullanılan alkol ile sterilizasyonda aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir.

- Alkol ile temas süresi en az 2 dakika olmalıdır.
- Alkol açıkta bırakılırsa suya göre daha fazla buharlaşır, konsantrasyonu düşer ve etkisi azalır. Bu nedenle işi biten alkol ağzı kapaklı bir kapta korunmalıdır.
- Alkolün etkinliği her çalışma periyodunda kontrol edilmelidir. Bu amaçla ekim işlemi bittikten sonra bir Plate Count Agar besiyerine 0,1 ml aktarılıp standart şekilde yayma yapıp, Petri kutusu 28°C 'da 48 saat inkübe edilmelidir. Bu Petri kutusunda mikroorganizma gelişmesi görülmemelidir.

1.4.4. Işınlama ile Sterilizasyon

Isıya duyarlı materyallerin ve ısıyla oluşabilecek fiziksel değişikliklerin istenmediği, numunelerin sterilizasyonunda kullanılır. İki farklı radyasyon formu kullanılmaktadır:

İyonize Olmayan Işınlama

UV Işınlama: Kimyasal aktiftir, hücre içinde atomların yer değiştirmesini teşvik eder, özellikle nükleik asitlerde ölümcül mutasyonlara neden olur. Nüfuz yeteneği zayıf olduğundan ancak yüzeylerin sterilize edilmesinde kullanılabilir. Bu nedenle laboratuvar steril kabinlerde, ekim odalarında havanın sterilizasyonu amacı ile kullanılmaktadır. Mikrobisidal dalga boyu spektrumu 240-280 nm'dir. Daha çok 269nm dalga boyu kullanılır.

Mikrodalga Işınlama: Sterilizasyon amaçlı değil daha çok besiyeri hazırlanmasında kullanılmaktadır. Etkisi ortam sıcaklığının yükselmesine dayanmaktadır.

İyonize Işınlama

Ultraviyole ışınlar gibidir, ancak nüfuz yeteneği çok daha yüksektir. Atomlara etki ederek, elektronların iyonizasyonuna neden olur. İyonize radyasyon DNA'yı ya doğrudan veya ürettiği aktif iyonlar ve serbest radikallerle dolaylı olarak etkiler. Bunların da etki mekanizmasının esası DNA bağlarının kırılması ve/veya onarım mekanizmalarına zarar verilmesine dayanmaktadır. Laboratuvar çalışmalarından ziyade ticari işlemlerde kullanılır. Ticari boyutta uygulama bulanı gamma ışınlarıdır.

1.5. Ekim Öncesi İşlemler

1.5.1. Örnek Alma

Tüm kitleden analiz etmek amacıyla alınan ve kitleyi temsil eden kısma örnek ve bu işlemede de örnekleme denilir. Bu temel kavram yanında birkaç kavramı daha açıklamak gerekir:

Ana Kütle: Aynı koşullarda üretilen gıdanın tamamını ifade eder. Kesikli üretim yapılan işletmelerde bir parti malı ifade eder.

Alan Örneği: Örnek olarak alınan materyalin tamamıdır ve örnek ünitelerinden oluşur.

Örnek Ünitesi: Analizde kullanılan örnek miktarıdır. Bazı durumlarda alan örneği ile örnek ünitesi aynı miktarda olabilir. Ancak arzu edilen alan örneğinin en az iki örnek ünitesi içermesidir.

Örnekleme Planı: partiyi temsilen seçilen belirli bir örnek grubu içerisinde, istenilen mikrobiyel kriterlere göre tüm partinin kabul veya red edilmesi için kaç örnekte (+) sonuca izin verildiğini gösteren plandır. Bu planda n=örnek sayısı, c=örnek grubu içerisinde izin verilen bozuk birim sayısı, m=bulunmasına izin verilebilecek mikroorganizma sınır değeri, M=bulunmasına izin verilebilecek mikroorganizmaların maksimum sınır değeridir.

Gıda örneğinin sağlıklı bir şekilde analiz edilebilmesi için aşağıdaki kurallara uyulması gerekir:

- Kalite kontrolünün temeli örnek almaya dayanır. Örneklemede esas: gıdayı temsil edecek şekilde ve miktarda almak, sonrada mikrobiyolojik niteliklerinde değişme olmaksızın laboratuvara taşımaktır. Genellikle örnek miktarı %2 olarak alınır. Ancak küçük partilerde %10'a kadar çıkarılabileceği gibi, büyük partilerde de %1'in altına da düşürülebilir.
- Örneklemede başarı için örnekler, eğitimli ve bu konuda otorite sahibi kişilerce aseptik şartlarda alınmalıdır.
- Örnek alımında bir rapor hazırlanmalı ve örneği alanın ismi; alındığı tarih, saat, yer; alma nedeni; gıdanın yapısı; ana kütlenin numarası, kodu, içerdiği ünite sayısı ve büyüklüğü; örnekleme yöntemi; alan örneği sayısı ve büyüklüğü; örnekleme sırasında ürünün sıcaklığı; yapılması istenilen testler ve diğer yararlı bilgiler bu rapora yazılmalıdır.
- Örnek hızla laboratuvara getirilip derhal analiz edilmelidir. Dondurulmamış gıdaların kabulden sonra 1 saat içerisinde analizine başlanmalıdır.
- Soğutulması gereken (örneğin pastörize içme sütü, çiğ süt, çiğ et, vb.) gıdaların analizinde örnek mutlaka soğutulmuş bir şekilde (0-5°C) laboratuvara getirilmeli ve hızla analize alınmalıdır. Dondurulmuş örnek ise analize kadar donmuş olarak muhafaza edilmelidir.
- Soğutulmuş örneklerin analizi aynı gün yapılamıyor ise bunların dondurularak saklanması halinde gerçek sayıdan daha düşük değerlerin alınabileceği unutulmamalıdır.
- Dondurulmuş meyve-sebze ve et ürünlerinin analizinde örnek buzdolabı koşullarında (2-5°C) maksimum 18 saat içerisinde çözündürülmeli, çözünme tamamlandıktan sonra hızla analize alınmalıdır. Eğer donmuş gıda dondurma gibi kolayca karıştırılabilecek formda ise çözündürülmesine gerek olmayabilir. Kolayca eriyebilen gıdaların 35°C'de etüvde 15 dakikada çözündürülmesi de önerilebilmektedir.
- Örnek sıvı veya yarı sıvı ise örnek kabı açılmadan önce iyice karıştırılmalıdır.
- Örnek farklı kısımlardan oluşuyor ise (yaş pasta gibi) her kısımdan örnek alınmalıdır. Ancak istenirse kısımlar ayrı ayrı da test edilerek her kısmın durumu aydınlatılabilir.
- İster orijinal ambalajında, ister tüketici ambalajında ve ister steril örnek kabında laboratuvara gelmiş gıdaların analizinde dışarıdan bir kontaminasyon olmamasına özen gösterilmelidir. Bu amaçla ambalaj türüne göre alkol veya uygun bir alkol bazlı dezenfektan ile ambalaj sterilize edilmeli, makas, konserve açacağı gibi açım ekipmanı önceden alkolde sterilize edilmiş olmalıdır.

1.5.2. Homojenizasyon ve Seyreltme

Gıdanın çeşidine göre değişmek üzere gıdada homojenizasyon ve/veya seyreltme yapılması gerekebilir. Homojenizasyon için blender veya stomacher yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Seyreltme çözeltilisi olarak Steril Fizyolojik Su (%0,85 NaCl) yaygın kullanım alanı bulmuşsa da, bugün Steril Fizyolojik Su (%0,85) + Pepton (%0,1) olan "Maximum Recovery

Diluent" yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çözelti "pepton – tuz" olarak da anılmaktadır. Yine % 0,1 pepton çözeltisi ile *Salmonella* analizinde kullanılan "tamponlanmış peptonlu su" seyreltme amacı ile kullanılmaktadır. Süt ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde seyreltme sıvısı olarak ¼ kuvvetinde Ringer çözeltisi kullanılmalıdır. Süt ürünleri dışında Ringer kullanmak gerekli değildir. Peynirlerde % 2 sodyum sitrat çözeltisi de kullanılmaktadır. Reçel, meyve suyu konsantresi gibi yüksek şekerli gıdalarda ozmofilik – ozmotolerant maya sayımında % 20 glikoz çözeltisi ilk ve daha sonraki seyreltmelerde kullanılır. Anaerobların analizinde de oksijeni bağlayan özel seyreltme çözeltisi kullanılması gerekmektedir.

Uygun yöntem ve seyreltme çözeltisi seçilmiş işlemde uyulması gerekli kurallar aşağıda özetlenmiştir:

- Homojenizasyonda blender kullanımında düşük hızdan başlanarak hız artırılır ve maksimum hızda 2 dakika süre ile parçalanır. Stomacherde orta hızda 1,5 dakika süre yeterli olmaktadır.
- Homojenizasyon (ilk seyreltme) ve sonraki seyreltmeler standart 1:10 oranında yapılır. Bunun için başlangıçta homojen gıdalarda 10 g (ml) gıda örneği 90 ml seyreltme çözeltisi ile heterojen gıdalarda ise 25 g (ml) gıda örneği 225 ml seyreltme çözeltisi ile homojenize edilir.
- Seyreltmenin 1:10 oranında yapılmasının nedeni hesap kolaylığı içindir. Petri kutusunda sayılan koloni basit olarak seyreltme faktörü ile çarpılır.
- Un ve hazır çorba gibi gıdalar 1:10 oranında seyreltilmesi durumunda özellikle sporlu bakteri sayımı için ısıtma işlemi uygulanması sonucunda pıhtılaşır. Bu nedenle homojenizasyon için başlangıç seyreltmesinin 1:20 oranında yapılması önerilir.
- Sayımı yapılacak bakteri sayısı çok az ise ve şeker, yoğurt, süttozu gibi suda kolaylıkla eriyen bir katı gıda kullanılıyor ise ilk seyreltme 1:4 oranında da yapılabilir.
- İlk 10^{-1} 'lik seyrelti yapıldıktan sonra 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltilere yine aynı seyreltme çözeltisi ile devam edilir. Bu seyreltmeler steril 1 ml pipet kullanılarak standart şekilde yapılır. Bu amaçla homojenizattan içerisinde 9 ml seyreltme sıvısı bulunan deney tüpüne 1 ml aktarılır ve tüp karıştırıcıda karıştırılır. Bu şekilde 10^{-2} 'lik seyrelti elde edilir. Buradan bir başka steril pipet ile 1 ml alınıp diğer tüpe aktarılır ve yine mekanik tüp karıştırıcıda karıştırılır. Bu tüp ise 10^{-3} seyreltidir. Aynı işleme yeterli dilüsyon elde edilinceye kadar devam edilir.
- Analiz edilecek gıda maddesi (baharat gibi) suda tam olarak erimiyor ise ilk seyreltinin (10^{-1}) yapıldığı erlen kendi halinde oda sıcaklığında 5 dakika bırakılır. Sonra steril bir 10 ml pipet ile sıvının üst tarafından 10 ml çekilip, steril bir tüpe aktarılır. Böylece daha sonraki pipetlemelerde pipetin gıda partikülleri ile tıkanması önlenmiş olur.
- Anaerob bakteri sayımı yapılacak gıdaların homojenizasyonunda blender yerine stomacher kullanılmalıdır. Gıda mikrobiyolojisinde gerekli olmamakla beraber, zorunlu anaerob bakterilerin analizinde özel seyreltme çözeltileri kullanılmaktadır.
- Sporlu bakteri sayımı yapılacak ise 80°C 'da 1 dakikalık pastörizasyon gereklidir. Ancak çeşitli yöntemlerde bu süre kaynar su banyosu veya serbest su buharında 30 dakikaya kadar çıkabilmektedir. Analiz talimatında belirtilmek kaydı ile pastörizasyon için önerilen diğer normlar da kullanılabilir. Bu amaçla 2 adet 10 ml sıvı gıda ya da katı gıdanın 10^{-1} seyreltisi 2 adet boş steril tüpe alınır. Bunlardan birisinin içine termometre daldırılır ve tüpler önceden sıcaklığı pastörizasyon sıcaklığının $2-3^{\circ}\text{C}$ üzerinde olan su banyosuna daldırılır. Kontrol olarak kullanılan (termometre bulunan) tüpün sıcaklığı istenen sıcaklığa erişince gereken süre kadar tutulur. Bu süre sonunda analiz edilecek tüp oda sıcaklığında bırakılarak soğutulur. Bu tüpün oda sıcaklığında bulunan su banyosuna konulması ile daha

abuk bir soğutma sağlanır. Ancak pastörize edilmiş tp hiçbir şekilde buzlu su banyosunda çabuk soğutulmamalıdır. Aksi halde termal şok nedeni ile olduğundan daha az sayıda sayım sonucu elde edilebilir. Gerekli ise 10^{-2} ve 10^{-3} 'lk seyreltiler pastörize edilmiş bu homojenizattan yapılır. Bu uygulamanın (nce pastörizasyon, sonra seyreltme) nedeni tüplerin farklı et kalınlığı vb. nedenlerle aynı ısıya maruz kalmamaları olasılığıdır. Termometre daldırılan tüp ile analiz edilecek tüpün aynı et kalınlığında olması, aynı hacimde materyal konulmuş olmasına dikkat edilmelidir.

- Seyreltme işlemi yapıldıktan en geç 15 dakika içinde ekim işlemi bitirilmif olmalıdır. Aksi halde bu süre içinde koliform bakteriler gibi hızlı çoğalan bakteriler sayılarını artırabilir. Homojenizasyon aşamasından itibaren ekime kadar geçen sürenin 30 dakikayı aşmamasına zen gösterilmelidir.

Gıda maddesinin mikrobiyolojik analizini gerçekleştirebilmek için uygun dilüsyon oranına gıdadaki olası mikroorganizma sayısı ya da istenilen kalite standartlarına göre karar verilebilir. Buna göre izelge 1'de bir örnek verilmiştir.

Çizelge 1. Gıdalarda Olası Mikroorganizma Sayısına Göre Seyrelti ve Ekim Yöntemi

Olası sayı	Sıvı gıda	Katı gıda
1.000.000 (10^6)	$10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$; yayma	$10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$; yayma
100.000 (10^5)	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$; yayma	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$; yayma
10.000 (10^4)	$10^0, 10^{-1}, 10^{-2}$; yayma	$10^{-1}, 10^{-2}$; yayma
1.000 (10^3)	$10^0, 10^{-1}$; yayma	10^{-1} ; yayma (tercihen 3 Petri)
100 (10^2)	10^0 ; yayma (tercihen 3 Petri)	10^{-1} ; yayma (3 Petri), dökme ; EMS
10 (10^1)	10^0 ; yayma (3 Petri), dökme ; EMS	EMS
1 (10^0)	EMS ; MF	EMS (10ml ekim)
<1	EMS (10ml ekim) ; MF	Sayım yapılmaz (uygun gıdada MF)

EMS: En Muhtemel Sayı ; MF: Membran Filtrasyon; 3 Petri kutusuna yayma 1 ml 'nin 3 Petri kutusuna eşit olarak paylaştırılması olup, 14 cm çaplı büyük Petri kutusuna doğrudan 1 ml aktarma ya da dökme yönteminde standart boyda Petri kutusuna 1 ml aktarmak aynı anlama gelmektedir

1.6. Ekim ve İnkübasyon

1.6.1. Ekim

Ekimlerde dikkate alınacak hususlar aşağıda verilmiştir:

- 9 cm çaplı standart petri kutusu için yaklaşık 15 ml besiyeri hesaplanmalıdır.
- Petri kutularına dökülecek besiyeri fazla miktarda hazırlanacak olursa kolay dökülemez ve dökme işleminin sonlarına doğru tatılaşmalar nedeni ile iyi karıştırılmaz. Bu nedenle örneğin 1 l besiyeri lazımsa 4 adet 250 ml olarak hazırlanması uygun olur.
- Seyreltme işlemi bitirildikten sonra hızla ekim yapılmalıdır. Bir rneğin ekimi tümüyle bitirildikten sonra diğer örneğin seyreltme işlemine başlanılması en uygunudur Yine sürenin aşılmaması için ekimde gerekli malzemenin tümünün kullanım sırasına göre hazırlanması ve sonradan olabilecek karışıklıkların önüne geçmek için ekim bilgilerinin önceden yazılması tavsiye edilir.
- Petri kutusuna örnek ile ilgili bilgiler kapaklar karışabileceği için taban kısmına cam yazar kalem ile yapılmalıdır.

- Sayım sonuçlarının güvenilirliğini artırmak için her seyreltiden 2 petri kutusuna paralel ekim yapılmalıdır.
- Ekim sırasında örneğin kontamine olmaması sağlanmalıdır.

1.6.2. İnkübasyon

İnkübasyonda dikkat edilecek hususlar aşağıda verilmiştir:

- Belirtilen inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile anaeroblar için önerilen gaz atmosferine uyulmalıdır. Bu amaçla inkübatör sıcaklığı minimum–maksimum termometre ile kontrol edilmelidir. Anaerob inkübatörler de uygun indikatörlerle kontrol edilmelidir.
- Özellikle 37°C ve daha yukarıdaki sıcaklıklarda yapılan inkübasyonlarda Petri kutularının ters çevrilerek inkübatöre konulması gerekir. Yine bu sıcaklık derecelerindeki inkübasyonlarda eğer süre 24 saatten fazla olacak ise inkübatöre en basit olarak içinde su olan bir beher konularak petri kutularında yüzey kuruması önlenmelidir.
- Membran filitasyon uygulamalarında ise Petri kutuları kapakları üstte, tabanları altta olacak şekilde (düz çevrilerek) inkübatöre konulmalıdır.
- İnkübatörde 6 'dan daha fazla cam Petri kutusunun üst üste konulmamasına özen gösterilmelidir. Bu değer plastik Petri kutularında 8 'dir.
- İnkübatörde sıcaklık değişimlerinin en aza indirilmesi için kapağın gereksiz yere açılmamasına özen gösterilmelidir
- İnkübasyon süresi sonunda oluşan koloniler hemen sayılmalıdır. Bekletmeler yanıltıcı sonuçların alınmasına yol açabilir.

1.6.3. Sayım

İnkübasyon sonunda Petri kutularında mikroorganizma koloni sayımı hızla yapılmalıdır. Daha önceden 30-300 arasındaki koloni içeren seyreltilerdeki ekimler dikkate alınır iken, artık ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının ağırlıklı aritmetik ortalaması alınarak örnekteki sayı hesaplanmaktadır. Ardışık seyreltilerden sayımda 15–300 arasındaki koloni içeren petriler dikkate alınmakla birlikte farklı kaynaklarda 15–250, 25–250 vb. gibi farklı sınırlara da rastlanmaktadır. Koloni sayısı hesaplandıktan sonra sonuç bir tam bir ondalık olacak şekilde katı gıdalarda cfu/g, sıvı gıdalarda cfu/ml olarak verilir. Ekim yapılan en derişik seyreltide bile koloni gelişmesi görülmezse sayının 0 olarak verilmesi hatadır. Bu gibi sonuçlar ekim yöntemine göre ancak <100 cfu/g, <10 cfu/g olarak verilir. Bu hesaplamada kullanılan formül aşağıda verilmiştir;

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

N = Gıda örneğinin 1 g ya da 1 ml 'sinde mikroorganizma sayısı

C = Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V = Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim (ml)

n₁ = İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

n₂ = İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

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

Örnek Proplem: Yayma kültürel sayım yöntemi uygulanmış ve her seyreltiden 2 Petri kutusuna ekim yapılmıştır. 10^{-2} seyreltide 200 ve 220, 10^{-3} seyreltide 20 ve 28 adet koloni elde edilmiştir. Formüle göre verileri açıkca düzenleyecek olursak;

$$C = 200 + 220 + 20 + 28 = 468$$

$$V = 0,1 \text{ (yayma kültürel sayım için Petri kutularına 0,1 'er ml pipetlenmiştir)}$$

$$n_1 = 2 \text{ (} 10^{-2} \text{ seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)}$$

$$n_2 = 2 \text{ (} 10^{-3} \text{ seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)}$$

$$d = 10^{-2} \text{ (ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır)}$$

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

$$N = 468 / [0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}]$$

$$N = 468 / [0,1 (2,2 \times 0,01)]$$

$$N = 212727,2727 \text{ cfu/g}$$

Bu değeri bir tam bir ondalık sayıya dönüştürürsek sonuç **N = 2,1 X 10⁵ cfu/g** (sıvı ise ml) olarak hesaplanmış olur.

Sayım sırasında karşılaşılabilecek özel durumlar ve yapılması gerekli işlemler aşağıda özetlenmiştir.

- Sonuç tek dilüsyondaki sayım sonuçlarının aritmetik ortalaması şeklinde verilecek ise; 1 yada 2 petri kutusundaki değerin ortalaması, yüksek dilüsyonda elde edilenin yarısından daha az ise doğrudan düşük dilüsyondaki değer
- Düşük dilüsyondaki değer 300 den fazla, yüksek dilüsyondaki ise 30 dan az ise 30-300'e en yakın olan dilüsyon
- Ardışık iki dilüsyondaki değerde <30 ise düşük dilüsyondaki değer
- Hiçbir dilüsyonda koloni gelişimi yoksa 0 cfu/g olarak değil <en düşük dilüsyon oranı cfu/g (<10 cfu/g gibi) verilir.
- >300 koloni olan petrinin sayılması gerekiyor ise 13 adet 1cm² alanda sayım yapıp sonuç 5 ile çarpılır.
- 1 cm² içinde >10 koloni varsa 4 adet 1cm² alan sayılır ortalaması alınır ve sonuç 65 ile çarpılır.
- 1 cm² içerisinde >100 koloni varsa sayım yapılmaz >65x100 x dilüsyon faktörü/g (veya ml) şeklinde sonuç verilir
- Birbiri ile temas eden koloniler 1 koloni olarak sayılırlar.
- Yayılmış kolonilerin kapladığı alan petri kutusunun yarısından fazla değilse ve diğer koloniler besiyerinde düzenli dağılım göstermişlerse , yayılma olmayan alanlarda temsili sayım alanları seçilerek sayım sonucu hesaplanır.

1.7. Mikroorganizma Analiz Yöntemleri

1.7.1. Katı Besiyerinde Sayım Yöntemleri

Katı besiyerinde sayımın prensibi "bir canlı hücrenin belirli bir inkübasyon sonunda 1 adet koloni oluşturmaktır". Bununla beraber, canlı olduğu halde hasar görmüş ve gelişip koloni oluşturamayacak canlı hücreler de gıda maddesinde bulunabilir. Bu nedenle sayım

sonuçları "sadece koloni oluşturabilenlerin" sayıldığını göstermek üzere "koloni oluşturan birim (kob) veya colony forming unit (cfu)" olarak verilmektedir.

Katı besiyeri kullanılan standart yöntemler dökme, yayma, damlatma, dönen tüp, lam üzerinde sayım, öze sürme yöntemi ile sayım olarak altı ana grupta ele alınır. Bunlardan dökme ve yayma yöntemleri rutin gıda analizlerinde kullanılır.

Dökme yönteminin uygulanışında analiz edilecek gıda maddesi gerekirse seyreltilerek ve/veya homojenize edilerek steril petri kutusuna 1 ml olarak aktarılır, üzerine sterilize edilmiş ve erimiş halde ancak 44-48°C sıcaklığa soğutulmuş agarlı besiyerinden 12-15 ml kadar dökülür, petri kutusunun masa üzerinde iken 8 çizilmesiyle veya 3 kez saat yönünde 3 kez de aksi yönde döndürülmesiyle örnek ile besiyeri karıştırılır ve katılaşması için bırakılır. Besiyerinin katılaşmasından sonra Petri kutuları inkübatöre kaldırılır. Dökme yöntemi kullanıldığında dikkat edilecek en önemli husus besiyeri sıcaklığıdır. Besiyeri çok sıcak olarak dökülürse mikroorganizmalar zarar görür, donma sıcaklığına çok yakın sıcaklıkta dökülürse petri kutusunda yeterli karışma sağlanmaz. Uygun sıcaklığa indirme için besiyeri otoklav sonrasında bir süre oda sıcaklığında bekletilerek veya çeşme suyu altında yavaşça çalkalanarak yaklaşık 50°C 'a soğutulur, sonra 45°C su banyosuna alınarak bu sıcaklığa düşürülür. Otoklav sonrasında besiyeri doğrudan 45°C su banyosuna alınırsa, su banyosu sıcaklığı yükselir ve soğuma gecikir. Besiyerinin uzun süre 45°C su banyosunda tutulması durumunda besiyeri performansını düşürebilir ve olduğundan daha düşük sayım sonuçları alınabilir.

Yayma yönteminde ise sterilize edilmiş besiyeri Petri kutusuna yaklaşık 12,5 ml hesabı ile dökülür. Bir diğer deyiş ile 100 ml besiyeri 8 Petri kutusuna eşit olarak dağıtılır. Besiyerinin katılaşması beklenir, yüzey kuruması sağlandıktan sonra sıvı gıda örneği ya da homojenizatından 0,1 ml aktarılır. % 76 'lık (v/v) alkolde tutularak sterilize edilmiş olan cam ya da çelik Drigalski spatülü alevden geçirilerek alkol uzaklaştırılır. Bu spatül kullanılarak besiyerine aktarılmış sıvı tüm yüzeye yayılır. Yayma tamamlandıktan sonra 15 dakika ters çevrilmeden beklenir ve sonra inkübatöre kaldırılır. Yayma yöntemi kullanıldığında dikkat edilecek en önemli hususlar besiyerinin yüzeyinin yeterince kurumuş olması ve spatülün sterilizasyonudur. Besiyeri gerek tam kurumamışsa gerekse de aşırı kurumuşsa ekim hataları ile karşılaşılabilir. Spatülün sterilizasyonunda da zamanla alkolün buharlaşmasına bağlı olarak konsantrasyon azalması olması dolayısıyla yetersizlik olabilir. Bu durumda alkolde önceki ekimlerden kontamine olmuş ve canlılıklarını sürdüren mikroorganizmalar da ekimi yapılan besiyerine geçerek koloni oluşturur ve olduğundan daha fazla sayıda sayım sonucu alınır. Bu olasılık özellikle toplam bakteri sayımında önemlidir. Alkoldeki spatülün alevden geçirilmesi sadece alkolün uzaklaştırılması içindir ve alkol yanarak uzaklaşırken ortaya çıkan ısı spatül üzerindeki mikroorganizmaları tahrip etmeyebilir. Spatül ile yaymada ikinci dikkat edilecek husus alkolde kalma süresidir. Seri bir ekim sırasında spatülün alkolde 2 dakikadan daha az kalması yeterli bir sterilizasyon sağlamayabilir. Bu nedenle ekim yoğunluğuna göre çok sayıda spatül kullanılması, bunların sıra ile alkolden çıkarılarak kullanılması gerekmektedir. Son olarak bunzen beki yanında duran alkolün alev alması tehlikesi oldukça yüksektir. Tüm bu sorunlar bir kez kullanılıp atılan (disposal) spatül kullanılması ile giderilebilir. Her ne kadar laboratuvar analizlerinde disposal spatül kullanılması bir masraf unsuru olarak düşünülse dahi, cam spatüllerin kırılabilir olması, alkol giderleri, kontaminasyon tehlikesi gibi faktörler dikkate alındığında kayda değer ölçüde avantajlı olduğu görülür.

Dökme ve yayma yönteminin kıyaslanmasında her iki yöntemin de birbirlerine göre üstünlükleri olduğu görülür.

- Dökme yönteminde 1 ml, yayma yönteminde 0,1 ml örnek petri kutusuna aktarıldığı için dökme yöntemi yayma yöntemine göre 10 misli daha duyarlıdır. Bu nedenle katı gıdalarda 100 adet/g, sıvı gıdalarda 10 adet/ml 'den daha az sayıda mikroorganizma olan gıdalarda dökme yönteminin uygulanması gerekir. Bununla beraber, 1 ml sıvının standart 3 Petri

kutusunda yayılması, 14 cm genişliğinde büyük Petri kutusuna doğrudan 1 ml aktarılması ile yapılacak yayma yöntemi de kullanılabilir.

- Dökme yönteminde agarlı besiyeri çok sıcak olursa termal şok nedeni ile mikroorganizmaya zarar verebilir. Çok soğuk olursa dökme sırasında besiyeri katılaşır ve iyi bir karıştırma sağlanamayabilir. Besiyeri sıcaklığı optimum olsa bile besiyeri ile çözeltinin homojen karışmasını sağlamak el deneyimi gerektirir. Oysa yayma yönteminde cam çubuk ile daha homojen bir dağılım sağlanır.
- Yayma yönteminde kullanılan cam çubuğun sterilizasyonu alkol ile yapılmaktadır. Alkol, konsantrasyon düşmesi sonucu sterilizasyon etkisini göstermez ve kontaminasyona neden olabilir.
- Yayma yönteminde besiyeri Petri kutusuna döküldükten sonra bir süre yüzeyin kurumaması beklenmelidir. Oysa dökme yönteminde böyle bir sorun yoktur. Dolayısı ile acil ekimlerde stokta önceden dökülmüş hazır besiyeri yoksa ve bu nedenle yeterince kurumamış besiyeri kullanılırsa kolonilerde yayılma oluşabilir. Dökme yönteminde ise besiyeri sterilize edildikten sonra erlende katılaştırılıp stoklanır ise yeniden eritmek gerekir, bu işlem besiyerine zarar verebilir.
- Dökme yönteminde mikroorganizmalar tüm besiyeri kütesine dağılır, buna bağlı olarak tabana yakın ve yüzeye yakın olan mikroorganizmalar oksijenden yararlanma farkı nedeni ile farklı büyüklükte ve morfolojide koloni oluşturur. Oysa yayma yönteminde tüm mikroorganizmalar yüzeyde olduğu için aynı şekilde oksijenden yararlanarak buna bağlı farklı büyüklükte koloni oluşturmazlar.

Yukarıdaki açıklamalardan görüldüğü gibi her iki yöntemin de birbirlerine göre üstün tarafları vardır. Ancak, genel olarak gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı rutin analizlerinde son yıllarda yayma yöntemi ile daha yaygın çalışılır.

1.7.2. En Muhtemel Sayı Yöntemi

Sıvı besiyeri kullanılan sayım yöntemi olarak "En Muhtemel Sayı ; EMS (Most Probable Number ; MPN)" yöntemi anlaşılr. Bu yöntem eski kaynaklarda "Kuvvetle Muhtemel Sayı ; KMS" olarak da anılır. Yöntemin esası ardışık 3 seyreltiden 3 'er adet sıvı besiyerine 1'er ml ekim, inkübasyon sonunda tüplerin pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmesi ile elde edilecek kodun, istatistik yöntemlerle elde edilmiş tablodan okunmasıdır. Yöntemin "En Muhtemel Sayı" olarak adlandırılma nedeni yukarıda da belirtildiği gibi örnekteki mikroorganizma sayısının istatistiki olarak elde edilmiş tablolardan yararlanılarak hesaplanmasıdır. Ekimi yapılan tüpe en az 1 adet canlı hücre geçti ise bu tüp inkübasyon sonunda pozitif sonuç verir. Aksine olarak tüpe 1 adet dahi canlı hücre geçmedi ise inkübasyon sonunda bu tüp negatif sonuç verir. Tüplerin değerlendirilmesinde; bulanıklık, asit üretimi ve gaz üretimi en önemli indikatörlerdir.

Gıda örneği sıvı ise orijinal örnekten (10^0 seyrelti) ekime başlanılabilir, böylelikle yöntemin duyarlılığı 10 kez artırılmış olur. Katı gıdada ise en düşük olarak 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} seyreltilerden 1 'er ml ekim yapılabilir. Bununla beraber, gerekirse katı gıda standart 10 g + 90 ml şeklinde homojenize edilir, 10^{-1} seyreltiden 10 ml hacim alındığında orijinal örnekten 1 g alınmış gibi olur. Burada dikkat edilmesi gereken husus 10 ml besiyerine 10 ml örnek aktarıldığında besiyerinin konsantrasyonunun yarı yarıya azalacağı, bunun önüne geçmek için başlangıçta bu besiyerlerinin çift kuvvette (2 misli konsantrasyonda) hazırlanmasıdır.

Yöntemin uygulanışında örnekteki mikroorganizma yükü hakkında bir bilgi yoksa ya da daha duyarlı sonuç elde etmek amacıyla ardışık 4 seyreltiden ekim yapıp, sonuçlar alındıktan

sonra hangi ardışık 3 seyreltinin EMS tablosunda kullanılacağı belirli bir kural çerçevesinde seçilebilir. Bu seçimde izlenmesi gereken kurallar aşağıda verilmiştir.

- Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1 'den fazla 3 pozitif sonuç varsa daha az konsantre olan seyrelti ile başlayan seri dikkate alınmalıdır. Örneğin gıda da 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olmak üzere ardışık 4 seyreltiden 3 'er tüpe yapılan ekimlerde sırası ile 3-3-2-1 şeklinde sonuç alındı ise 3-2-1 serisi dikkate alınmalıdır.
- Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1 adet 3 pozitif sonuç varsa 3 pozitif alınan seri ile başlanmalıdır. Örneğin sırasıyla 3-2-1-0 şeklindeki bir seride değerlendirilecek olan 3-2-1 'dir.
- Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 0 adet 3 pozitif sonuç varsa sondaki seri dikkate alınmalıdır. Örneğin 2-1-1-0 serisinde 1-1-0 serisi kullanılmalıdır. Ancak birden çok 3 negatif sonuç varsa (örneğin 2-1-0-0) bu kez 2-1-0 serisi kullanılmalıdır.

EMS yönteminde değerlendirme amacı ile çok sayıda ve farklı yaklaşımlar ile tablolar hazırlanmıştır. Bunlardan en yaygın kullanılanı Çizelge 2 'de verilmiştir. Çizelgede 1, 2 ve 3 olarak gösterilen 3 kategori vardır. Bu kategoriler sonuçların bir anlamda güvenliğini göstermektedir. 1 nolu kategori ile elde edilen kodlar güvenli olup, laboratuvar tarafından doğrudan değerlendirilir. 2 nolu kategoride elde edilen kodlar daha az güvenilirdir. Tercihen, bu şekilde elde edilen kodlar üst yetkiliye danışılarak değerlendirilmelidir. 3 nolu kodlar ise kayda değer ölçüde güvenilirmez olup, tercihen deney tekrarlanmalı ya da mutlaka üst yetkilinin onayı ile değerlendirilmelidir.

Çizelgede pozitif tüp kodunun belirlenmesinde 1-0,1-0,01 olarak verilen ekimler sırasıyla 10^0 ; 10^{-1} ; 10^{-2} seyreltilerden sırasıyla 1'er ml ekim yapılması anlamındadır. Yukarıda da belirtildiği gibi katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden 10 ml ekim, 10^0 seyreltiden 1 ml ekim anlamındadır. Bu şekilde yapılan ekim sonucunda örneğin 3-2-1 sonucu elde edildi ise gıdanın 1 ml 'sinde (ya da 1 gramında) 15,00 adet mikroorganizma olduğu anlaşılır. Sıvı bir gıdada sırasıyla 10-1-0,1 ml ekim yapıldı ve 3-2-1 sonucu elde edildi ise yukarıdaki örnekte verilen tüm değerler 10 ml için geçerlidir, bir diğer deyişle gıdanın 1 ml' sinde $15,00/10 = 1,50$ adet mikroorganizma bulunmaktadır. Tersine olarak sırasıyla 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltilerden yapılan ekimlerde yine 3-2-1 sonucu alındı ise 1 g (ya da 1 ml) örnekte $15,00/0,01 = 1500$ adet mikroorganizma bulunmaktadır.

EMS yönteminde sonuçlar standart EMS tablosundan sonuç hesaplandıktan sonra sıvı gıdalarda EMS/ml, katı gıdalarda EMS/g olarak verilir.

Çizelge 2. EMS Çizelgesi (EMS/g ; EMS/ml)

Pozitif tüpler			Sayı ve kategori		Pozitif tüpler			Sayı ve kategori	
1 ml	0,1 ml	0,01 ml	EMS	Kategori	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	EMS	Kategori
					2	2	1	2,80	3
0	0	0	< 0,30	-	2	3	0	2,90	3
0	1	0	0,30	2	3	0	0	2,30	1
0	2	0	0,62	3	3	0	1	3,80	2
1	0	0	0,36	1	3	0	2	6,40	3
1	1	0	0,74	1	3	1	0	4,30	1
1	1	1	1,10	3	3	1	1	7,50	1
1	2	0	1,10	2	3	1	2	12,00	3
1	2	1	1,50	3	3	2	0	9,30	1
1	3	0	1,60	3	3	2	1	15,00	1

2	0	0	0,92	1	3	2	2	21,00	2
2	0	1	1,40	2	3	2	3	29,00	3
2	1	0	1,50	1	3	3	0	24,00	1
2	1	1	2,00	2	3	3	1	46,00	1
2	2	0	2,10	1	3	3	2	110,00	1

1.7.3. Membran Filtrasyon

Membran filtrasyon sistemi özellikle içme suyu ve berrak meyve suları gibi filtrasyonda sorun çıkarmayan ve çok az sayıda mikroorganizma bulunabilen örnekler için kullanılır. Benzer şekilde suda tam olarak eriyebilen şeker, tuz gibi gıdaların analizinde de kolaylıkla kullanılmaktadır. Her ne kadar mikrobiyolojik kurallar çerçevesinde membran filtrasyon yöntemi 1 gram ya da 1 ml 'sinde 1'den daha az sayıda mikroorganizma aranması için kullanılmalı ise de pratik kullanımı nedeni ile daha fazla sayıdaki mikroorganizmaların belirlenmesinde de gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında yaygın kullanım alanı bulmuştur.

Membran filtrasyon yönteminin uygulaması aşağıda özetlenmiştir:

- Membran filtrasyon sistemi sterilize edilir. Sterilizasyon işlemi ekipmanın özelliğine göre otoklavda yapılabileceği gibi, basit olarak alkol ya da uygun bir kimyasal ile de yapılabilir. Otoklavlama parametresi 121°C'da 20 dakikadır. Kimyasal dezenfeksiyon uygulanırsa dezenfektanın kolaylıkla sistemden uzaklaştırılması gerekir. Aksi halde sistemde kalan dezenfektan analizi yapılacak mikroorganizmaya da zarar verebilir. Bu nedenle dezenfektan madde uzaklaştırıldıktan sonra sistemde kalması olası dezenfektanın analiz öncesi 50 ml kadar steril destile su filitre edilerek yıkanması pratik ve etkili bir uygulamadır.
- Aseptik koşullara uyularak filitrenin yerleştirileceği tabla steril su ile ıslatılır ve filitre buraya yerleştirilir. Koruyucu plastik tabaka filitreden ayrılır ve süzme haznesi yerine takılır.
- Beklenen ya da hedef sayıya (50mm çaplı filtre için örnek içinde 50-100 hücreden fazla hücre bulunmamalı, aksi halde seyreltme uygulanmalı) uygun miktarda sıvı hazneye konulur (en az 10-20 ml sıvı filtreden geçirilmelidir), pompa çalıştırılır ve örnek membran filtreden geçirilir. Süzme işlemi tamamlandıktan sonra çeperlerde kalmış olması muhtemel mikroorganizmaların da alınması için 10-20 ml kadar steril su ile çalkalanır. İlave steril su geçirme işlemi, klor gibi inhibitör maddelerin varlığında daha da önemlidir. Bu yöntemde filtrasyonun kolaylaştırılması amacıyla sisteme önceden ilave edilen ya da filtrasyon bitiminde haznede kalmış olabilecek mikroorganizmaların da filtreye aktarılması veya filtre üzerinde kalmış klor gibi mikroorganizma gelişmesini baskılayacak maddelerin yıkanması için ilave edilen steril saf suyun miktarı önemli değildir. Çünkü bu su steril olduğu için mikroorganizma bulundurmaz, önemli olan filitre edilecek örnek miktarıdır.
- Filtre, mikroorganizmaların kaldığı yüzey üstte kalacak şekilde steril bir pens ile Petri kutusundaki besiyerine yerleştirilir. Filtre üreticisi firma tarafından sağlanan ve özel olarak üretilmiş besiyerine koyulabileceği gibi laboratuvarında standart olarak hazırlanan katı besiyeri üzerine de yerleştirilebilir.
- İnkübasyonda Petri kutuları ters çevrilmez.
- Membran filitreden fiilen geçirilen miktar esas alınarak sonuçlar cfu/ml ya da cfu/g olarak verilir.

Membran filitre sıvı besiyerine de ilave edilebilir. 100 ml dere suyunda *Salmonella* olup/ olmadığının araştırılmasında en pratik yol 100 ml dere suyunu filitre edip, filitreyi olduğu gibi standart yöntemle hazırlanmış zenginleştirme besiyerine atmaktır. Standart analizlerden farklı olarak bu uygulamada besiyeri miktarı standart değildir ve pratik uygulamada 40–50 ml besiyeri kullanılır.

FDA ve diğer bazı yurtdışı kuruluşlar tarafından Hidrofobik Grid Membran Filter (HGMF ; hidrofobik ızgara sistemli membran filitre) tekniği uygulanmaktadır. Bu sistemde filitre üzerinde, hidrofobik oldukları için üzerlerinde su ve dolayısı ile mikroorganizma tutulmayan şeritlerin oluşturduğu kareler vardır. Bu şeritlerden dolayı koloni gelişmesi bu kareler içerisinde meydana gelir ve karenin pozitif (koloni gelişmiş) ya da negatif (koloni yok) olarak sayılması ile elde edilen değer özel bir formül ile sonuç EMS olarak verilir. Daha çok ABD 'de akademik çalışmalarda kullanılan bir yöntem olup, Avrupa ülkelerinde yaygın kullanım alanı bulmamıştır.

1.7.4. Tüp Dilüsyon Yöntemi (Titre Belirlenmesi)

Örnekteki mikroorganizma düzeyini "pozitif sonucun alındığı en seyreltik seyrelti" ile belirleyen bir yöntemdir. Rutin test dilüsyonu adı ile de bilinir. Yöntemin uygulanmasında materyalden önce standart seyreltmeler hazırlanır. Seyreltmenin hangi basamağa kadar gideceği amaca ya da beklenen/ kabul edilen sayıya göre değişir. Seyreltmeler yapıldıktan sonra her tüpten ayrı ayrı olmak üzere uygun besiyeri bulunan tüplere 1'er ml örnek aktarılır. İnkübasyondan sonra tüplerin pozitif ya da negatif oldukları kontrol edilir. Aşağıda Çizelge 3'de farklı örneklerde TAMB titresinin belirlenmesi üzerine bir örnek verilmiştir.

Çizelge 3. Farklı Gıdalarda Belirlenmiş TAMB Titre Değerleri

Örnekler	Seyreltiler								
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Yoğurt	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Peynir	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Çiğ süt	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Su	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Buradaki örneğe göre TAMB titresi yoğurtta 10^8 , peynirde 10^7 , çiğ sütte 10^5 ve su'da 10^2 olarak verilir. Bu yöntem bir anlamda En Muhtemel Sayı yönteminin ham şeklidir. Peynir analizinde 10^{-7} seyreltidede pozitif sonuç alındığına göre bu seyreltiden en az 1 canlı hücre besiyerine geçmiştir. Bu sayı 1 kabul edilse orijinal örnekte en $1,0 \times 10^7$ /g sayıda koliform bakteri olduğuna karar verilir. Benzer şekilde 10^{-8} seyreltiden 1 adet dahi canlı bakteri besiyerine geçmemiştir. Geçse idi "örneğin 1 g 'ında 10^8 sayıda koliform grup bakteri olduğuna" karar verilecek idi. Aksi gerçekleştiğine göre sonuç "örneğin g 'ında 10^7 ile 10^8 arasında TAMB vardır" şeklinde verilebilirse de gerçekte bu sonuç yanıltıcı olabilir. Çünkü bu yöntem kantitatif veya yarı kantitatif (analiz sonucunu belirli sınırlar arasında belirleyen) bir sayım yöntemi değildir. Sonuç titre olarak verilmelidir. Eğer mikroorganizma sayısı belirlenmek isteniyorsa EMS yöntemi kullanılmalıdır.

Titre belirlenmesi özel grup mikroorganizmaların titresinin belirlenmesinde de kullanılabileceği gibi, aynı zamanda faj düzeyi (faj titresi), antikor düzeyi (titresi) belirleme vb. gibi çalışmalarda da kullanılmaktadır.

1.7.5. Metabolizmaya Dayalı Hızlı Analizler

Mikroorganizmalar gelişmeleri sırasında ortamda bulunan bazı maddeleri kullanarak yeni ürünler meydana getirirler. Tüketilen veya üretilen ürünlerin kantitatif ölçülmesi ile mikrobiyal gelişme hakkında bilgi edinilebilir. Bu ölçümler basit olarak gelişmenin olup olmadığını gösterebileceği gibi, ölçümlerin önceden hazırlanmış standartlar ile karşılaştırılması ile mikroorganizma sayısı da belirlenebilir. Bu yöntemler genellikle hızlı analiz amacıyla kullanılan testlerdir ve empedans (kondüktans) değişimi, CO₂ oluşumunun belirlenmesi, resazurin indirgenmesi, metilen mavisi indirgenmesi, besiyerinin renk değiştirmesi vb. şekillerde yapılabilir. Metilen mavisi indirgenme testini burada örnek olarak vererek yöntemi açıklayalım.

Analizi yapılacak sütün 10 ml 'si steril bir tüpe alınır, üzerine filitre ile sterilize edilmiş 50 ppm metilen mavisi (Merck 1.15943) çözeltisinden 1 ml ilave edilir ve tercihen su banyosunda 37°C 'da inkübasyona bırakılır. Sütte bulunan bakterilerin gelişmesi sonucunda üretilen redüktaz enzimi ile mavi renkli metilen mavisi indirgenerek renksiz loko metilene dönüşür ve sütün beyazlaşır. Doğal olarak çiğ sütte bulunan bakteri sayısı başlangıçta ne kadar fazla ise metilen mavisinin tümüyle indirgenmesi için gereken süre o denli kısa olacaktır. Bir diğer deyiş ile bakteri sayısı ile sonucun alındığı süre ters orantılıdır. Bu ilişki bir seri deneme ile standart sayım amacı ile de kullanılabilir. Farklı mikrobiyolojik kalitelere sahip sütlerle metilen mavisi indirgeme testi uygulanır ve indirgeme süresi belirlenip, buna paralel olarak aynı çiğ süt örneklerinde toplam mezofil bakteri sayımı yapılır ve sayım sonuçlarının logaritması metilen mavisi indirgeme süresine göre grafik haline getirilir. Doğal olarak bu grafiği çizmek için ne kadar fazla örnek ile çalışılırsa o denli iyi bir grafik elde edilir ve burada önerilen en düşük sayı 25'dir. Grafiğin istatistik yöntemlerle çizilmesi önerilir. Grafik basit olarak en basit bilgisayarlarda da bulunan Excel programından da kolaylıkla çizilebilir.

Grafik elde edildikten sonra yapılacak iş sadece metilen mavisi indirgeme süresine karşı kaç adet bakteri bulunduğunu grafikten hesaplamaktan ibarettir. Ayrıca grafiğe gerek olmadan basit istatistiksel regresyon formülleri ile de süreye karşı gelen bakteri sayısı hesaplanabilir. Sütte bunun için hazırlanmış standart tablolar bulunmaktadır (Çizelge 4).

Çizelge 4. Metilen Mavisi İndirgenme Süresine Göre Sütteki tahmini Bakteri Sayısı

İndirgenme Süresi	Bakteri Sayısı /ml	Sütün Kalitesi
20 dakikadan az	2.0x10 ⁷ 'den fazla	Çok kötü
20 dakika – 2 saat arası	4.0x10 ⁶ -2.0x10 ⁷	Kötü
2-5 saat arası	5.0x10 ⁵ -4.0x10 ⁶	Orta
5-10 saat arası	5.0x10 ⁵ 'den az	İyi
10 saatten fazla	5x10 ⁴ 'den az	Çok iyi

Metilen mavisi indirgeme vb. metabolizmaya dayalı tüm hızlı testler üzerinde temel sakınca popülasyondaki bakterilerin metabolik aktivite farkıdır. Analizi yapılan üründe metabolik aktivitesi yüksek az sayıda bakteri varsa analiz sonucu yüksek sayıda bakteri olarak elde edilecektir. Buna karşı fikir ise çiğ sütte bakteri sayısının değil, asıl önemli olanın mevcut bakterilerin metabolik aktivitesine bağlı olarak sütün bozulma potansiyelinin belirlenmesidir ve bu karşı fikir geçerlidir.

1.7.6. Canlandırma

Mikrobiyolojik analizlerde "özellikle işlem görmüş gıdalar" doğrudan analize alınırsa "var/yok testlerinde sahte negatif" ya da "gerçekte olduğundan daha az" sayım sonucu alınabilir. Bunun temel nedeni kurutma ya da soğutma işlemi sırasında mikroorganizmaların

ölmemesi, ancak ciddi şekilde "ağır" yaralanmasıdır. Bu gibi işlemler sonucunda mikroorganizmaların bir kısmı normal aktivite ile yaşamlarına devam eder, bir kısmı temel yaşam fonksiyonlarını az bir hasar ile sürdürür, bir kısmı bu yaşam fonksiyonlarını kayda değer ölçüde "ağır yaralanmış olarak" yitirir ancak bunlar halen "canlıdır" ve bir kısmı da ölür. Standart mikrobiyolojik analizler sırasında yaşamlarını normal olarak sürdüren ve "az hasarlı" olanlar kolaylıkla belirlenir iken, "ölmüş" olanlar analiz ile belirlenemez. Burada asıl sorun "ağır yaralı" olanların belirlenmesidir.

Toplam mezofil aerob bakteri sayımı gibi bir analizde bu tip bakteriler belirlenebilir. Burada tek olumsuzluk katı besiyerinde kısıtlı serbest su nedeni ile ağır yaralı bakterilerin gelişiminde bir zorlamadır. Ancak *Listeria* var/ yok testinde olduğu gibi doğrudan selektif besiyerine ekim sonunda bu bakterilerin gelişip analiz sonucunu "var" olarak göstermeleri beklenemez. Selektif besiyerleri bu tip "ağır yaralı" bakterilerin gelişmelerine izin vermez. Her ne kadar selektif besiyerlerinde asıl amaç refakatçi floranın baskılanması olmakla beraber, çoğunlukla hedef bakteri üzerinde de minimum düzeyde olumsuz etkisi olmaktadır. Hedef bakteri ne denli stres altında ise bu olumsuz etki o denli yüksek olur ve hatta analizde negatif sonuç alınır.

Oysa, bu bakteriler gıdaların depolama süreçlerinde "kendilerini tedavi ederek" eski aktivitelerini kazanır ve hastalık yapabilirler. Bu durumda önemli olan bu bakterilerin standart analiz ile belirlenmesidir. Canlandırma (resuscitation) adı verilen bu işlem özellikle var/ yok testi ile analizi yapılan patojenlerin selektif besiyerinde belirlenmesi için uygulanmaktadır. *Listeria* analizinde canlandırma işlemi için selektif zenginleştirme besiyerine selektif katkı maddeleri ilave edilmeden 4 saat inkübasyon kayda değer bir canlandırma sağlamaktadır. *Salmonella* analizinde uygulanan "selektif olmayan besiyerinde ön zenginleştirme" işlemi de aslında basit bir canlandırma işlemidir. Buna göre canlandırma işlemi selektif olmayan ortamlarda (besiyeri, inkübasyon sıcaklığı vb.) yapılır. Ayrıca standart "toplam mezofilik aerobik bakteri" sayımında da uygulanabilir.

Canlandırmada üzerinde durulması gereken en önemli husus diğer mikroorganizmaların da gelişerek hedef mikroorganizmanın gelişimini engellemesidir. Bu nedenle canlandırma işlemi uzun süreli olarak yapılmamalıdır. Uzun süreli canlandırma işlemi sayım öncesinde yapılacak ise sayım sonucunu etkilemeyecek kadar kısa tutulmalıdır. Bu amaçla 30 dakikalık canlandırma işlemi uygundur.

1.7.7. Var/ Yok Testleri

Sayım yapılamayacak kadar az sayıda mikroorganizma içeren örneklerde ya da hedef mikroorganizmanın belirli bir miktar gıdada olmaması hedef alınıyorsa var/yok testleri yapılır.

Bunun için su örneğini verirsek; amaç 100 ml su örneğinde bakteri olmaması ise basit olarak örnek filitreden geçirilir, inkübasyon sonunda filitre üzerinde hiç koloni olmaması beklenir. Bu analiz sonucunda filitre üzerinde koloni gelişmesi olur ise işletmeye gelen suyun mikrobiyolojik kalitesinin bozuk olduğuna karar verilir. Yine 100 ml su örneği çift kuvvette hazırlanmış uygun bir sıvı besiyerine ekilir, inkübasyon sonunda besiyerinde mikroorganizma gelişmemesi hedef alınır. Eğer mikroorganizma gelişimi olmaz ise sonuç "yok/100 ml" olarak verilir. Tersine olarak besiyerinde gelişme olur ise sadece standardın dışında kaldığı anlaşılır ancak, sayım yapılmadığı için suyun standardın ne kadar dışında olduğu anlaşılamaz. Bir diğer deyiş ile 100 ml suda 1 adet ya da 1000 adet bakteri olması arasındaki fark bu şekilde anlaşılamaz.

Bazı mikroorganizmaların var/ yok analizi 1 'den fazla aşamada yapılır. Örneğin 10 g gıdada koliform bakteri olması istenmiyor ise 10 g gıda 100 ml Brilliant Green Bile Broth besiyerinde inkübe edilir, buradan alınan 1 ml örnek dökme yöntemi ile VRB Agar besiyerine

aktarılır. Patojen bakterilerin analizinde de bu yöntem uygulanır. *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 serotipinin 25 g (ya da 25 ml) gıdada bulunmasına izin verilmez. Bu bakterilerin analizinde çeşitli aşamalardaki zenginleştirme uygulamaları ve katı besiyeri ekimleri vardır. Sonuç olarak katı besiyerinde yapılan ekim sonunda 1 adet dahi hedef mikroorganizma kolonisi olmaması gerekir

Var/ yok test sonuçlarının verilmesi basit olarak analizi yapılan miktardaki gıdada aranan mikroorganizmanın var ya da yok olduğunun belirtilmesi şeklindedir.

1.7.8. Biyolojik Stabilite Testi

Özelikle ticari steril olarak tanımlanan gıdalarda önemli bir testtir. Salça, meyve suları ve konsantreleri, reçeller vb. yüksek kuru madde ve/ veya yüksek asitlik içeren gıda maddelerinin biyolojik olarak dayanıklılıkları UHT yöntemi ile işlenmiş içme sütünden farklıdır. Burada örneği verilen tüm gıda maddeleri oda sıcaklığında depolanan ve pazarlanan gıdalardır.

İçme sütü pH 'sı, kuru maddesi, besin içeriği özellikleri nedeni ile mikroorganizma atağına karşı son derece açık bir üründür. Isıl işlemde yetersizlik ve/veya daha sonraki kontaminasyonlarda bu sütte mikroorganizma bulunursa ürün çok büyük olasılıkla bozulur çünkü, mikroorganizma gelişmesini engelleyen hemen hemen hiçbir engel yoktur. Oysa salça, meyve suları ve konsantreleri, reçeller vb. ürünlerde her hangi bir şekilde mikroorganizma kalır ise mikroorganizmanın cinsi ve türü ürünün bozulması üzerinde önemlidir.

Örneğin, salçada bulunan laktik asit bakterisi salçayı bozmakla beraber, meyve suyu konsantresine bulaşacak laktik asit bakterisi çok da önemli olmaz. Tersine olarak salçaya bulaşacak ozmofil maya salça için öncelikle tehdit değil iken, meyve suyu konsantresi için ozmofilik maya en önemli bozulma etmenidir. Bu arada sporlu bakterilerin türü salça ve meyve suyu konsantresi için önemli olabilir.

Salçada her hangi bir şekilde bulaşan ozmotolerant maya standart maya küf analizi sırasında belirlenebilir. Benzer şekilde toplam bakteri analizi sırasında laktik asit bakterileri meyve suyu konsantresinin toplam bakteri analizi sırasında koloni oluşturabilir. Bununla beraber, salçada ozmofilik mayanın gelişerek salçayı bozması ve benzer şekilde meyve suyu konsantresinde laktik asit bakterisinin gelişerek meyve suyunda bozulma yapma olasılığı çok düşüktür. Ancak bu mikroorganizmalar standart analizler sırasında gelişerek koloni oluştururlar, bir diğer deyiş ile varlıklarını gösterirler.

Dolayısı ile yüksek asitlik ve/ veya kuru madde ile korunan bu gibi gıdalarda biyolojik stabilite testi ürünün güvenliği açısından standart analizlere göre daha önemlidir. Kuşkusuz, standart analizler ile ürünün toplam kalitesi hakkında bir bilgi edinilirse de bu şekilde ürünün güvenliği hakkında fazlaca bilgi edinilemez.

Biyolojik stabilite testi basit olarak ürünün normal depolama koşullarında yeterli bir süre incelenmesidir. İlave olarak ekstrem depolama koşullarında da inceleme yapılarak bu koşullar altında da ürünün güvenilir olup olmadığı belirlenir. Örneğin salçada oda sıcaklığında, 28–30°C 'da ve 55°C 'da yapılan 2 haftalık depolaması sonunda mikrobiyolojik açıdan bir değişiklik olmaması gerekir.

Bu test, işletme şartlarında yapıldığında ürünün güvenilip olup olmadığını saptamak pratik uygulamada her zaman yararlı değildir. Örneğin yine salçada bu test uygulandığında ve ürün "güvenilmez" olarak tanımlandığında o analizin yapıldığı parti zaten büyük olasılıkla bozulmuş olacaktır. Bir diğer deyiş ile laboratuvar sonuçları ile depoda bekleyen ürün benzer süreler içinde bozulmuş olacaktır. Bununla beraber, inkübasyonun belirli bir aşamasında örnek alınarak sayım yapılması ile bozulma eğilimi saptanabilir.

1.8. Kullanılmış Malzemenin Yıkınması

Rutin gıda analizinde kullanılan ilk seyreltme (homojenizasyon) ve diğer seyreltmelerde kullanılan cam malzeme, seyreltme çözeltileri, pipetler ekim işleri bitirildikten sonra 1 saat içinde yıkanır. Otoklavlanmadan doğrudan yıkanabilir. Daha uzun süre beklerse özellikle seyreltme çözeltileri içinde mikroorganizma gelişmesi olacağı için artık bunlar "mikroorganizma gelişmiş malzeme" olarak değerlendirilip, otoklavlandıktan sonra yıkanır.

Patojen bakteri olduğundan endişe edilen gıdaların analizinde kullanılan istisnasız tüm malzemeler ile içinde mikroorganizma gelişmesi olmuş tüm kültürler mikroorganizmanın patojen, saprofit, yararlı olduğuna bakılmaksızın otoklavlanıp sterilize edildikten sonra yıkanmalıdır.

Mikrobiyolojik analizlerde yıkama öncesi gerçekleştirilen sterilizasyonun normu standart besiyeri sterilizasyonundan daha yüksektir. Sıcaklık yine 121°C iken, süre 30 dakika olarak uygulanmalıdır. Bu nedenle yıkama öncesi sterilize edilecek malzeme ile yeni hazırlanan besiyerlerinin sterilizasyonu aynı otoklavlama işleminde yapılmaz. İdeal olarak bu amaçla 2 ayrı otoklav kullanılmalıdır.

Biyokimyasal test uygulanmış tüplerin yıkama öncesi otoklavlanması kimyasal buharları açısından mümkün olmayabilir. Örneğin indol testi uygulamasından sonra amil alkol ve HCl buharları sağlığa ve otoklava zarar verir. Bu durumda kimyasal maddeler ile dezenfeksiyon yoluna gidilmelidir. Kimyasal madde dezenfeksiyonunda dikkate alınması gereken husus dezenfektan seçimi ve başta süre olmak üzere uygulama koşullarıdır. İndol testinde kullanılan Kovacs' ayırıcının içindeki amil alkol ve HCl zaten dezenfektan gibi davranıp mevcut mikroorganizmaları öldürür. Bu testin yapıldıktan sonra tüplerin oda sıcaklığında 1 gece beklemesi yeterlidir.

Yıkamadan sonra iyi bir durulama son derece önemlidir. Cam malzemede kalabilecek deterjan kalıntıları mikroorganizma gelişmesini engelleyebilir.

Plastik (tek kullanımlık; disposal) malzeme özel otoklav poşetleri içinde sterilize edildikten sonra atılır.

2. Bölüm

Mikroorganizma Analizleri

2.1. Koliform Grup Bakteri Sayımı

Koliform grup bakteriler gıdalarda hijyen indikatörü olarak değerlendirilir. Bu nedenle gıdalarda koliform grup bakteri sayısının yüksek olması istenmez. Koliform grup bakteriler çok yaygın şekilde EMS yöntemiyle sayılır. Ancak katı besiyerinde sayım da uygulanabilmektedir.

Koliform grup bakterilerin analizinde inkübasyon sıcaklığı olarak çok yaygın bir şekilde 35–37°C kullanılmakla beraber, son zamanlarda 30°C 'da inkübasyon da kullanılmaktadır. Bunlardan 30°C'ın genel olarak proses kontrolü, 35–37°C 'ın ise ürünün potansiyel sağlık riskini göstermesi amacıyla uygulandığı kabul edilmektedir. Analiz raporunda inkübasyon sıcaklığının belirtilmesi kaydı ile her 2 sıcaklık da uygulanabilir.

2.1.1. EMS Yöntemi ile Sayım

EMS yöntemi ile koliform grup bakteri sayımı için selektif olan LST Broth besiyerinde inkübasyondan sonra gaz oluşumu görülen tüplerden BGLB Broth besiyerine doğrulama

amacıyla ekim yapılır. Bu besiyerinde inkübasyondan sonra gaz oluşumu görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilir ve EMS tablosundan koliform grup bakteri sayısı EMS/g veya EME/ml) olarak hesaplanır. Rutin uygulamada BGLB Broth doğrulamasına gerek yoktur.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, tartılır, homojenize edilir.
- En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak, içinde Durham tüpü ve 10 ml LST Broth bulunan deney tüplerine, uygun ardışık dilüsyonların her birinden 1'er ml ekilir. Örnekten 10 ml ekim yapılıyorsa LST Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır.
- 37°C'da 48 saat inkübasyon sonrasında bakteri gelişmesine bağlı bulanıklık görülen deney tüpleri içerisindeki Durham tüplerinde gaz oluşup oluşmadığı kontrol edilir. Bulanıklık ve gaz oluşan tüpler muhtemel pozitif olarak işaretlenir. Gaz oluşumu esastır.
- Bu pozitif tüpler yine içerisinde Durham tüpü olan BGLB broth besiyerine ayrı ayrı inoküle edilir, 37°C 'da 24 saat inkübasyondan sonra Durham tüplerinde gaz görülen tüpler koliform grup doğrulanmış pozitif olarak değerlendirilir.
- Elde edilen kod standart EMS tablosu ile değerlendirilerek gıdadaki koliform grup yükü EMS/g (ml) olarak hesaplanır ve sonuç verilir.
- Analiz sonunda mikroorganizma ile temas eden her malzeme sterilize edilerek yıkanır ya da atılır.

2.1.2. Katı Besiyerinde Sayım

Koliform grup bakterilerin katı besiyerinde sayımı için pek çok agarlı besiyeri bulunmakla beraber, rutin uygulamada yaygın olarak VRB Agar kullanılmaktadır.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntem ile VRB Agar besiyerine ekim yapılır.
- 37°C'da 24 saat inkübasyon sonunda koliform grup bakteriler VRB Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı etrafında pempe presipat olan koyu kırmızı koloniler oluşturlar. Sayımda >0.5mm çaplı koyu kırmızı ve etrafında pembemsi çökelti oluşmuş tüm koloniler sayılır, bakteri sayısı hesaplanır ve cfu/g (cfu/ml)olarak sonuç verilir.

(1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler laktoz pozitif *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri olan koliform grup bakteriler olarak sayılır. Enterokoklar ve koliform grup dışındaki *Klebsiella* türleri bu besiyerinde toplu iğne başı büyüklüğünde küçük pembe koloniler oluşturlarken, laktoz negatif *Enterobacteriaceae* üyeleri renksiz koloniler meydana getirirler)

-Petri kutuları otoklavlandıktan sonra yıkanır veya atılır.

2.2. Fekal Koliform Bakteri Sayımı (EMS Yöntemi)

Fekal koliformlar, koliform grubun içinde yer alırlar ve doğrudan fekal kontaminasyon indeksi olarak aranırlar. Fekal koliform bakteriler ile saptanan üyelerin hemen tamamı *E. coli* olduğu için rutin uygulamada sadece *E. coli* aranması yeterlidir. Bununla beraber, *E. coli* analizi dışında doğrudan fekal koliform analizi de yapılmaktadır. Standart yöntemle fekal koliform analizi EMS yöntemi ile yapılır ve koliform grup bakterilerin analizinin devamı olarak uygulanır.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, tartılır, homojenize edilir.
- En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak, içinde Durham tüpü ve 10 ml LST Broth bulunan deney tüplerine, uygun ardışık dilüsyonların her birinden 1'er ml ekilir. Örnekten 10 ml ekim yapılıyorsa LST Broth besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır.
- 37°C'da 48 saat inkübasyon sonrasında bakteri gelişmesine bağlı bulanıklık görülen deney tüpleri içerisindeki Durham tüplerinde gaz oluşup oluşmadığı kontrol edilir. Bulanıklık ve gaz oluşan tüpler muhtemel pozitif olarak işaretlenir.
- LST Broth besiyerinde gaz oluşumu görülen her tüpten içinde Durham tüpü olan EC Broth besiyerine 1 öze aşılama yapılır. EC Broth tüpleri önceden 45°C su banyosunda ısıtılmış olmalıdır.
- İnkübasyon 45°C su banyosunda yapılır. Çoğunlukla ilk 24 saat içinde pozitif sonuç alınmakla beraber, standart analiz yönteminde süre 48 saattir. İnkübasyon mutlaka 45°C'de ve mikropresör kontrollü su banyosunda yapılmalıdır. Normal inkübatörler bu amaçla asla kullanılamaz. Hassas kuru inkübatörlerin kullanılması durumunda mutlaka maximum-minimum termometre ile sıcaklık salınımı kontrol edilmelidir. Fekal koliform bakteri analizinde su banyosu sıcaklığı kritiktir. Düşük olursa fekal olmayan koliformların da gelişme olasılığı (sahte pozitif sonuç), yüksek olursa fekal koliformlarının gelişememe olasılığı (sahte negatif sonuç) vardır. Bu nedenle inkübasyon süresince su banyosu sıcaklığının da maksimum-minimum termometre ile kontrol edilmesi gereklidir. Bazı kaynaklarda inkübasyon sıcaklığı 44,5°C olarak verilmektedir. ISO 45±0,5°C'da, FDA ise 45,5±0,2°C 'da inkübasyon önermekte, ancak kabuklu deniz hayvanları ve bunların yetiştirildiği sular için inkübasyonun 44,5±0,2°C'da yapılması gerektiğini uyarılmaktadır. Uygulanan inkübasyon sıcaklığı rapora mutlaka yazılmalıdır.
- İnkübasyon bitiminde EC Broth içindeki Durham tüplerinde gaz birikmesi kontrol edilir, gaz olan tüpler pozitif olarak değerlendirilir ve standart EMS tablosu kullanılarak sonuç hesaplanır.
- Analiz sonunda mikroorganizma ile temas eden her malzeme sterilize edilerek yıkanır ya da atılır.

2.3. *E. coli*

E. coli sıcak kanlı hayvanların (memeliler ve kanatlılar) bağırsak sistemlerinde bulunur. Bu nedenle her hangi bir örnekte *E. coli* 'ye rastlanması o örneğe doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaştığının göstergesidir.

Gıdalarda standart yöntemle *E. coli* aranması EMS yöntemi ile yapılmakta ve bu analiz 5 gün sürmektedir. MUG 'lu besiyerlerinin (Fluorocult) kullanılması ile bu süre 24 saate düşmüştür.

E. coli 'lerin % 98-99 'u β -D-glucuronidase enzimi içerir. Diğer bakterilerde çok ender olarak görülen bu enzim 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) substratını parçalar ve parçalanma ürünlerinden 4-methylumbelliferone uzun dalga boylu (366 nm) UV lambası ile floresan ışığa verir.

MUG, VRB Agar gibi katı besiyerlerine katıldığı gibi LST Broth gibi sıvı besiyerlerine de katılmakta, ayrıca Bactident *E. coli* gibi test şeritleri ile de kullanılmaktadır. MUG yöntemi FDA tarafından hızlı *E. coli* analizinde 1998 yılından beri kullanılmaktadır. *E. coli* suşları içinde %1–2 oranında MUG negatif olması *E. coli* sayımında standart analiz yöntemine göre %1–2 oranında daha az sayım sonucu alınacağını gösterir. Bununla beraber, standart EMS yöntemi *E. coli* analizinin 5 gün sürmesi, su banyosu sıcaklığının kritik olması nedeni ile bu yöntemde de hata şansının olması gibi dezavantajlar dikkate alındığında MUG yöntemi özellikle rutin gıda analizlerinde yaygın kullanım alanı bulmuş ve uluslararası standartlarda hızlı yöntem olarak kabul görmüştür. Katı besiyerinde MUG esası ile sayımda da yine %1–2 oranında az sayılma olasılığı olmakla birlikte, koloni identifikasyon tekniği ile sayımın IMViC ya da IMVIC testleri ile 3 gün sürmesi nedeni ile katı besiyerlerinde de MUG tekniği yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

2.3.1. Klasik EMS Yöntemi ile Sayım

Standart yöntemle *E. coli* sayımı EMS yöntemi ile yapılır ve fekal koliform analizinin devamı olarak uygulanır.

- Fekal koliform analizinde pozitif çıkan EC brotlardan EMB agara çizme ekim yapılır. 37°C'de 24 sat inkübasyona bırakılır.
- EMB agarda ortası koyu merkezli metalik yeşil röfle veren yoksa vermeyen tek kolonilerden yatık Nutrient agar plaklarına 3-4 koloniden çizme ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılır.

(35–37°C'da 24 saat inkübasyon sonunda saydam, amber renkli koloniler *Salmonella* ve *Shigella* gibi laktoz ve sakkaroz negatif bakterileri, menekşe renkli ve yansıyan ışıkla yeşilimsi metalik parlak görülen koloniler *E. coli* 'yi, pembe – menekşe renkli, mukoid, gri kahverengi merkezli koloniler *Enterobacter*, *Klebsiella* ve diğer koliformları gösterir)

İnkübasyon sonucu gelişen koloniler gram boyamaya tabi tutulur ve Gram (-) çubuk şeklinde iseler dört ayrı biyokimyasal test uygulanır.

İndol Testi

Bu testte triptofandan indol üretilip üretilmediği belirlenir.

- Kültürden Tryptone Broth veya Peptone water içeren besiyerine ekim öze ile yapılır ve 35-37°C'de 24 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon süresi sonunda Kovac çözeltisinden 0.2-0.3 ml ilave edilir, karıştırılır. 10 dakika içerisinde besiyerinin yüzeyinde halka şeklinde koyu kırmızı halka oluşumu pozitif sonuçtur. Kavun içi veya sarı halka negatif kabul edilir.

Metil Red-Voges Proskauer Testi

Bu test glikozun fermentatif olarak yıkım şeklini dolaylı olarak gösterir. Pozitif Metil Red testi mikroorganizmanın glikozdan karışık asit fermentasyonu ile yüksek oranda asit

ürettiğini gösterir. Voges Proskauer testi ise mikroorganizmanın pruvik asitten asetil metil karbinol üretilip üretilmediğini saptamak amacı uygulanır.

- Kültürden 6 ml MR-VP besiyerine ekim yapılır ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon süresi sonunda kültürün 1 ml'si VP testi için temiz bir tüpe aktarılır. Geride kalan 5 ml besiyerinde de MR testi yapılır.
- MR testi için tüpte kalan 5 ml kültür üzerine 4-5 damla metil red indikatörü damlatılır. Renk kırmızıya dönerse pozitif, sarı ise negatif olarak değerlendirilir. MR indikatörü pH 4.5'in altında ise kırmızı renk verir.
- Yeni tüpe aktarılmış 1 ml besiyerine önce 0.6 ml %5'lik α -naftol sonra 0.2ml %40'luk KOH çözeltisi eklenir tüp 20 saniye kuvvetlice çalkalanır. 5 dakika içerisinde kırmızı renk gözleniyorsa sonuç pozitif olarak değerlendirilir.

Sitrat Testi

Test edilen mikroorganizmanın karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığı saptanır.

- Nutrient agardaki kültürden alınarak SFS'de süspansiyon hazırlanır ve bundan karbon kaynağı olarak sadece sitrat içeren yatık hazırlanmış Simmon Citrate Agar besiyerine çizgi usulu ekim yapılır.
- 35-37°C'de 4-7 gün inkübasyona bırakılır. Süre sonunda besiyerinin yeşilimsi rengi maviye dönerse sonuç pozitif, renk değişimi olmazsa negatif olarak işaretlenir.

Sonucun Değerlendirilmesi

Tüm biyokimyasal testlerde elde edilen sonuçlar aşağıda verilen veriler dikkate alınarak değerlendirilir ve *E. coli* varlığı belirlenen tüpler pozitif olarak kabul edilerek EMS tablosundan sayı EMS/g (EMS/ml) olarak hesaplanır.

	I	MR	VP	C
Tipik <i>E. coli</i>	+	+	-	-
Atipik <i>E. coli</i>	-	+	-	-
Tipik <i>E. aerogenes</i>	-	-	+	+

2.3.2. EMS Yöntemi ile Hızlı Sayım (MUG Tekniği)

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 pozitif olanlar UV el lambası ile *E. coli* açısından kontrol edilir.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, tartılır, homojenize edilir.
- En Muhtemel Sayı yöntemi ile analiz kurallarına uyularak LST+MUG Broth tüplerine ekilir. Gerekliyse besiyeri başlangıçta çift kuvvet olarak hazırlanır.
- 37°C 'da 24 saat inkübasyon sonrasında bakteri gelişmesine bağlı bulanıklık görülen tüplerde Durham tüplerinde gaz oluşup oluşmadığı kontrol edilir. Bulanıklık ve gaz oluşan tüpler pozitif olarak işaretlenir, standart EMS tablosundan gıdadaki koliform grup bakteri yükü EMS/g (ml) olarak hesaplanır ve sonuç verilir. Rutin kontrolde 24 saat inkübasyon yeterlidir.

- Koliform grup bakteri pozitif olan tüpler UV el lambası ile tercihen loş bir yerde kontrol edilir. Bunlardan floresan ışığa verenler *E. coli* pozitif olarak işaretlenir. Tüp içinde aşırı asit gelişimi floresan ışığı maskelleyebilir 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. Bazı cam tüpler ise kendiliğinden floresan ışığa verirler. Analize başlamadan önce boş tüp UV lambası ile kontrol edilmeli, bunlardan kendiliğinden floresan ışığa verenler MUG esaslı analizlerde kullanılmamalıdır. MUG esaslı analizlerde kullanılacak cam malzeme siparişinde "kendiliğinden floresan ışığa vermeyen" tüp istendiği özellikle belirtilmelidir. Bu güne kadar Petri kutularında, erlenlerde ve şişelerde kendiliğinden floresan verenlere rastlanılmamıştır. Bununla beraber, MUG esaslı çalışmalarda kullanılacak tüm cam malzemenin önceden "kendiliğinden floresan verip vermediği" kontrol edilmelidir.
- MUG reaksiyonunda sahte pozitif sonuçlardan kaçınmak için indol testi uygulanır. Floresan ışığa görülen tüplere 1 ml Kovacs' indol çözeltisi damlatılır, elle yavaşça karıştırılır, en geç 1 dakika içinde (genellikle 5–10 saniye) besiyeri yüzeyinde vişne renkli halka toplanması indol testinin pozitif olduğunu gösterir. *E. coli* MUG ve indol pozitif tek bakteridir. Rutin gıda kontrolünde pozitif MUG sonuçlarının indol testi ile doğrulanması gerekli değildir. Bu test daha çok araştırma esaslı çalışmalarda uygulanır.
- EMS tablosundan gıdadaki *E. coli* yükü EMS/g (ml) olarak hesaplanır ve sonuç verilir.
- Analiz sonunda mikroorganizma ile temas eden her malzeme sterilize edilerek yıkanır ya da atılır. İndol testi uygulanmış tüpler otoklavlanmaz, bunlar 1 gece kendi halinde bırakılarak kendiliğinden (oto) sterilizasyon sağlanır.

2.3.3. Katı Besiyerinde Hızlı Sayım

Koliform grup bakterilerin analizinde olduğu gibi *E. coli* sayımında da pek çok besiyeri olmakla birlikte, VRB Agar, VRB Agar+MUG, Chromocult Coliform Agar besiyerleri rutin gıda analizlerinde yaygın olarak kullanılan besiyerleridir.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.
- VRB Agar besiyerinde 37°C 'da 24 saat inkübasyon sonunda 1–2 mm çaplı (>0.5mm) koyu kırmızı koloniler koliform grup bakteri olarak sayılır. Bunlardan rastgele 10 adedi seçilir, her koloni 0,2 ml steril suda çözülür ve ayrı ayrı Bactident *E. coli* test kitinin küvetlerine yerleştirilir. Küvetlere 1 adet test şeridi ilave edilir, 2 saat inkübasyon sonunda UV el lambası ile floresan ışığa kontrol edilir. Floresan ışığa gösteren koloniler *E. coli* olarak değerlendirilir. İdentifikasyon esaslı sayım tekniği ile Petri kutusundaki kolonilerin ne kadarının *E. coli* olduğu belirlenir, buradan gıda örneğindeki *E. coli* sayısı hesaplanır standart kurallara göre sonuç verilir.
- VRB+MUG Agar besiyerinde 37°C 'da 18 saat inkübasyon sonunda 1–2 mm çaplı koyu kırmızı koloniler UV el lambası ile kontrol edilir. Bunlardan floresan ışığa verenler *E. coli* olarak işaretlenir. Bu şekilde *E. coli* sayısı hesaplanır standart kurallara göre sonuç verilir.

VRB+MUG Agar besiyerinin 18 saatten uzun süre inkübasyon yapılması halinde floresan ışığa yayılmakta ve tüm Petri kutusunu kaplayarak pozitif ve negatif kolonilerin ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır.

- Chromocult Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı koyu mavi–menekşe renkli koloniler *E. coli* olarak işaretlenir, sayı hesaplanır standart kurallara göre sonuç verilir.
- Mikroorganizma ile temas etmiş tüm malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır ya da atılır

2.4. Toplam *Enterobacteriaceae* Sayımı

Genel olarak hijyen kontrolü amacıyla toplam *Enterobacteriaceae* sayımı gerekebilir. Yöntemin prensibi koliform grup bakteri analizinde kullanılan ve laktoz pozitif olan koliform bakterilerin koyu kırmızı koloni oluşturmalarını sağlayan VRB Agar besiyerinden laktozun çıkartılıp, bunun yerine glikoz (dekstroz) koyularak glikozu kullanan tüm *Enterobacteriaceae* üyelerinin koyu kırmızı koloni vermesini sağlamaktır.

Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar besiyerinde standart yayma ya da dökme yöntemiyle ekim ve inkübasyondan sonra bu besiyerinde oluşan tipik kolonilerin sayılarak toplam *Enterobacteriaceae* sayısı belirlenir.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile VRBD Agar besiyerine ekim yapılır.
- 37°C'da 24 saat inkübasyon sonunda 1–2 mm çaplı koyu kırmızı koloniler *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri olarak sayılır, bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

2.5. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı

Genel olarak hijyen kontrolü amacıyla toplam bakteri sayımı yapılır. Toplam bakteri ile kasıt "toplam aerobik mezofilik bakteri" sayımıdır. Çoğu kez Plate Count Agar olmak üzere genel bir besiyerinde standart yayma ya da dökme yöntemiyle ekim ve inkübasyondan sonra oluşan kolonilerin sayılarak koloni oluşturabilen bakteri sayısının belirlenmesi şeklinde yapılır.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile Plate Count Agar besiyerine ekim yapılır.
- Eğer analiz edilen örnekte Petri kutusunun yüzeyini kaplayacak şekilde yayılma yapan bakteriler olduğundan kuşkulaniyor ise ekimden sonra Plate Count Agar üzerine 45°C'da tutulan 4 ml Su-Agar besiyeri ile kapatılır ve bu uygulama analiz raporunda belirtilir.

- 28-32°C'da 48 saat inkübasyon sonunda besiyerinde gelişen tüm koloniler toplam bakteri olarak sayılır, bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

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

2.6. Toplam Psikrofil Bakteri Sayımı

Düşük sıcaklık derecelerinde gelişen psikrofil ve psikrotrof bakterilerin sayımıdır.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile Plate Count Agar besiyerine ekim yapılır.
- 6,5°C'da 7-10 gün inkübasyon sonunda gelişen tüm koloniler toplam bakteri olarak sayılır, bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

Uyarı : Rutin ve standart uygulamada inkübasyon sıcaklığı 6,5°C ve süre 10 gündür. 4,5 °C 'da 14 günlük inkübasyon da uygulanmaktadır. Bu nedenle inkübasyon parametreleri mutlaka rapora yazılmalıdır. Süt ürünlerinde toplam bakteri analizinde Plate Count Skim Milk Agar besiyeri kullanılması IDF ve ISO (17410) tarafından önerilmektedir. İnkübasyon sıcaklığı kritiktir. Maksimum-minimum termometre ile kontrol edilmelidir.

2.7. Toplam Termofil Bakteri Sayımı

Yüksek sıcaklık derecelerinde gelişen termofil bakterilerin sayımıdır.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile ekim yapılır.
- 45°C'da 48–72 saat inkübasyon sonunda Plate Count Agar besiyerinde 1–2 mm çaplı tüm koloniler toplam bakteri olarak sayılır, bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

Not : Rutin ve standart uygulamada inkübasyon sıcaklığı 45°C ve süre 48–72 saattir. İnkübasyon sıcaklığı 55°C ve inkübasyon süresi 48–72 saat olarak seçilebilir. İnkübasyon

parametreleri mutlaka rapora yazılmalıdır. IDF ve ISO (17410) 'ya göre süt ürünlerinde toplam bakteri analizinde Plate Count Skim Milk Agar besiyeri kullanılmalıdır. İnkübasyon sıcaklığı kritiktir. Maksimum–minimum termometre ile kontrol edilmelidir.

2.8. Toplam Halofil Bakteri Sayımı

Halofil karakterli olan ve gelişmeleri için mutlak olarak tuza gereksinim duyan bakteriler ile halotolerantların sayımında Plate Count Agar besiyerine amaca uygun olarak %2–8 NaCl eklenir ve standart yöntemle sayım yapılır.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile %2-8 tuz eklenmiş Plate Count Agar besiyerine ekim yapılır.
- 28-32°C'da 48 saat inkübasyon sonunda gelişen tüm koloniler toplam bakteri olarak sayılır, bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

2.9. Maya–Küf Sayımı

Gıda işletmelerinde maya küf sayımı genel hijyenik kontrol olarak yapılmaktadır. Genel olarak maya-küfler pH değeri 5.0 ve daha asit ortamlarda ve düşük aw değerlerinde gelişirler. Kullanılan besiyerinin asitleştirilmesi bakteri gelişmesini engeller, maya-küf gelişimini teşvik eder. Son yıllarda bakteri gelişimini engellemek için asit ilavesi yerine antibiyotikli besiyerlerinin kullanımı tercih edilmektedir. En yaygın kullanılanı da Oxytetracycline Gentamicin Yeast Extract Glucose Agardır.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile 3.5 pH değerine asitlendirilmiş Potato Dextrose Agar veya Malt Extract Agar besiyerine ekim yapılır.
- 20-25°C'da 3-5 gün inkübasyon sonunda gelişen tüm koloniler sayılır, maya-küf sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

2.10. *Staphylococcus aureus* Sayımı

S. aureus patojen bir bakteridir, 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 kullanılabilir.

Gıdalarda *S. aureus* bulunması gıda hazırlama yerinin temiz olmadığına, cild, ağız ve burundan bulaşma olduğuna işaret kabul edilir.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, tartılır, homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Baird–Parker Agar bazal besiyerine Egg Yolk–tellurit emülsiyonu 50ml/l olacak şekilde ve besiyeri sıcaklığı 50°C'nin altına soğutulduktan sonra ilave edilir.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden seyreltiden 0.1 ml alınıp standart boy Petri kutusuna aktarılır. Yayma işleminden sonra Petri kutusu 15 dakika bekletilir ve ters çevrilerek 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.
- Baird-Parker Agar besiyerinde etrafı saydam zonlu 1–1,5 mm çaplı siyah parlak konveks koloniler *S. aureus* olarak sayılır ve örnekteki sayı standart yöntemle hesaplanır.

Koagülaz Testi

- Koagülaz pozitif olanları belirlemek için 5-10 tipik koloni Brain Heart Broth'da 37°C'de 18-24 saat inkübe edilir.
- İki adet küçük test tüpüne 0.5 ml tavşan veya insan plazması konulur ve bunlardan birinin üzerine 0.5 ml inkübe edilmiş BHI kültürü ilave edilir
- 35-37°C'de 4 saat inkübe edilir. Koagülasyon 1-4 saat içinde meydana gelir ancak sonuç negatif ise 24 saat beklenmelidir. Tüpte koagülüm oluşmuş ve hafif sallantıda parçalanmıyorsa sonuç pozitif olarak kabul edilir.
- Koagülaz testi için alınan toplam koloni sayısından koagülaz pozitif olanların sayısından hareketle petri kabında sayılmış tipik *S. aureus* sayısından orantı ile Koagülaz pozitif *S. aureus* sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.
- Analiz sonunda mikroorganizma ile temas eden her malzeme sterilize edilerek yıkanır ya da atılır.

2.11. Lipolitik Bakteri Sayımı

Özellikle süt ürünlerinde süt yağını parçalayarak istenmeyen tat ve kokulara neden olan lipolitik bakteriler standart yayma kültürel sayım yöntemi ile belirlenir.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile Trybutyrin Agar besiyerine ekim yapılır.
- 28°C'da 48 saat inkübasyon sonunda besiyerinde etrafı berrak zonlu tüm koloniler lipolitik bakteri olarak sayılır, lipolitik bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

2.12. Proteolitik Bakteri Sayımı

Özellikle süt ürünlerinde proteini parçalayarak istenmeyen tat ve kokulara neden olan proteolitik bakteriler standart yayma kültürel sayım yöntemi ile belirlenir.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda doğrudan analize alınabilir ya da seyreltileri yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden yayma ya da dökme yöntemi ile Calcium Caseinate Agara ekim yapılır.
- 28°C'da 48 saat inkübasyon sonunda besiyerinde etrafı berrak zonlu tüm koloniler proteolitik bakteri olarak sayılır. Zonları belirginleştirmek için Petri kutusuna 5 ml asetik asit ilave edilebilir. Benzer şekilde besiyerine sterilizasyon öncesi 5 g/L yağsız süttozu (Skim Milk) ilave edilebilir
- Proteolitik bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

2.13. Rope Sporu Sayımı

Rop, toprak kökenli olan *Bacillus subtilis* suşlarının gelişmesi ile ekmeklerde görülen bir bozukluktur. Gram pozitif, spor oluşturan çubuk şeklinde bir bakteri olan *B. subtilis* 'in mukoz oluşturan suşları daha önce *B. mesentericus* olarak adlandırılmıştır.

Analiz

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, tartılır, homojenize edilir. Homojenizasyonun standart 1:10 seyreltme şeklinde yapılması mümkünse de, unlarda bu oranda yapılan seyreltme durumunda ısıtıl işleminden sonra yoğun bir bulamaç elde edilmesi nedeni ile ilk seyreltmenin 1:20 oranında yapılması ve sayım sonunda bu seyreltinin dikkate alınması gerekmektedir.
- Homojenizat, şahit örnek de kullanılarak, 80°C 'da 5 dakika süre ile pastörize edilir, soğutulularak standart şekilde seyreltmeler yapılır.
- En Muhtemel Sayı 3'lü tüp yöntemi ile Nutrient Broth veya Amos Kent-Jones besiyeri içeren deney tüpüne analiz kurallarına uyularak belirlenen 3 ardışık dilüsyondan ekim yapılır.
- 28-32°C'da 24-48 saat inkübasyon sonrasında bakteri gelişmesine bağlı bulanıklık ve üstte zar oluşumu pozitif olarak değerlendirilir. Rutin kontrolde 24 saat inkübasyon yeterlidir.
- Standart EMS tablosundan gıdadaki rope sporu yükü EMS/g (ml) olarak hesaplanır ve sonuç verilir.

2.14. Ekşime Yapan Sporlu Bakteri Sayımı

- Gıda örneği mikrobiyolojik analiz genel kuralları çerçevesinde laboratuvara getirilir, tartılır, homojenize edilir. Homojenizasyonun standart 1:10 seyreltme şeklinde yapılması mümkünse de, unlarda bu oranda yapılan seyreltme durumunda ısıtıl işleminden sonra yoğun bir bulamaç elde edilmesi nedeni ile ilk seyreltmenin 1:20 oranında yapılması ve sayım sonunda bu seyreltinin dikkate alınması gerekmektedir.

- Homojenizat, şahit örnek de kullanılarak, 80°C 'da 5 dakika süre ile pastörize edilir, soğutulur ve standart şekilde seyreltmeler yapılır.
- Beklenen ya da hedef alınan sayıya göre doğrudan örnekten ya da uygun bir seyreltisinden 20 ml alınarak, 100 ml 45-50°C'deki Brom Cresol Purple Dextrose Agar besiyerine ekim yapılır.
- Erlenlerdeki aşılınmış besiyeri 5 Petri plağına eşit olarak dağıtılır. Katılaştıktan sonra üzeri su agar çözeltisi ile ince bir katman halinde kaplanır
- 55°C'de 48 saat inkübasyondan sonra 2-3 cm çapında ortası koyu renkli, etrafında sarı hale olan koloniler sayılır.
- Ekşime yapan bakteri sayısı hesaplanır ve sonuç cfu/g (cfu/ml) olarak verilir.

2. Bölüm

Yaygın Olarak Laboratuvarda Hazırlanan Besiyeri ve Çözeltilerin Bileşimi

3.1. Seyreltme Çözeltileri

3.1.1. Steril Fizyolojik Su

NaCl	8.5 g
Distile Su	1.0 l

Konsantrasyonda hazırlanan dilüsyon sıvısı amaca göre 225 ml, 90 ml, 9 ml olacak şekilde kaplara dağıtılıp, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrasında laboratuvar sıcaklığında 1 ay depolanabilir.

3.1.2. % 0.1 Peptonlu Su

Pepton	1.0 g
Distile Su	1.0 l

Pepton su içinde eritilir ve amaca uygun olarak tüplere ve/veya erlenlere dağıtılıp, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir.

3.1.3. Maximum Recovery Diluent (Peptonlu Fizyolojik Su)

Sodyum klorür	8.5 g
Pepton	1.0 g
Distile su	1.0 l

Bileşenler eritilerek hazırlanan dilüsyon sıvısı amaca göre 225 ml, 90 ml, 9 ml olacak şekilde kaplara dağıtılıp, otoklavda 121°C 'da 15 dakika sterilize edilir.

3.1.4. Ringer Çözeltisi (1/4)

Sodyum klorür	2.25 g
Potasyum klorür	0.105 g
Kalsiyum klorür	0.12 g
Sodyum bikarbonat	0.05 g
Distile su	1 l

Bileşenler distile suda eritilip, erlen ve/veya tüplere uygun hacimlerde dağıtılıp otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir.

3.1.5. % 20 Glikoz Çözeltisi

Glikoz (dextrose monohidrat)	20.0 g
Distile Su ile	100.0ml'tamamlanır
Ozmofilik – ozmotolerant mayaların analizinde kullanılır.	

3.1.6. % 2 Sodyum Sitrat Çözeltisi

Tri Sodyum Sitrat	20.0 g
Distile Su	1.0 l

Özellikle peynirlerin seyreltilmesi amacı ile kullanılır. Tri Sodyum Sitrat distile su içinde 45–50°C'da ısıtılarak eritilir, pH'sı otoklav sonrasında 25°C'da 7.5 ± 0.2 olacak şekilde ayarlanır, amaca uygun erlen ve/veya tüplere dağıtılıp, otoklavda 121°C 'da 15 dakika sterilize edilir.

3.1.7. Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi

Casein pepton	1.0 g
Cystein chloride monohydate	0.5 g
Sodyum Klorür	8.5 g
Distile Su	1.0 l

Anaerobların homojenizasyonu ya da seyreltmeleri için ortamdaki oksijeni bağlayan bu çözelti kullanılması uygundur. Bileşenler distile su içinde gerekirse ısıtılarak eritilir ve uygun kaplara (erlen ve/ veya tüpler) dağıtılarak otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir.

3.2. Ayıraçlar

3.2.1. Kovacs

p-dimetilaminobenzaldehit	5.0 g
Amil alkol	75.0 ml
HCl (Konsantre)	25.0 ml

Koyu renkli şişede buzdolabında saklanmalıdır.

3.2.2. α -Naftol

α -Naftol	5.0 g
Etil alkol	100.0 ml

Kararsız bir çözeltilidir. Bu nedenle taze hazırlanmalıdır. Koyu renkli şişede buzdolabında 1 haftaya kadar muhafaza edilebilir. Dikkat! Karsinojendir.

3.2.3. Metil Kırmızısı

Metil Kırmızısı	0.01 g
Etil alkol (%95'lik)	30.0 ml
Distile su	20.0 ml

Metil kırmızısı önce etil alkolde çözünür sonra su ilavesi yapılır.

3.3. Boyalar

3.3.1. Metilen Mavisi (Ölü-Canlı maya sayımı için)

Metilen Mavisi	0.02 g
Distile su	50.0 ml

Sodyum bifosfat	0.018 g
Potasyum dihidrojenfosfat	2.7 g
Distile su	50.0 ml

İki çözelti hazırlandıktan sonra eşit oranda karıştırılır ve renkli bir şişede saklanır.

3.3.2. Kristal Viyole

Kristal Viyole	2.0 g
Etil alkol (%95'lik)	20.0 ml

Amonyum okzalat	0.8 g
Distile su	80.0 ml

Ayrı ayrı hazırlanan iki çözelti karıştırılır, 1/10 oranında sulandırılır ve filtre kağıtından süzülür.

3.3.3. Karbol Fuksin (Asit-Fast Boyama İçin)

Bazik Fuksin	0.3 g
Etil alkol (%75'lik)	10.0

Fenol	5.0 g
Distile Su	95.0 ml

İki çözelti ayrı ayrı hazırlandırdıktan sonra karıştırılır. 2 gün sonra kullanılır. (Fenol kristalleri önce ısıtılır, eriyen fenolün üzerine su ilave edilir.)

3.3.4. Sulu Fuksin (Gram ve Basit Boyama İçin)

Karbol Fuksin	1.0 ml
Distile Su	19.0 ml

3.3.5. Gram İyot Çözeltisi

İyot	1.0 g
KI	2.0 g
Distile su	300.0 ml

I ve KI havanda iyice ezilir. KI distile belirtilen miktar distile suda eritilir. Daha sonra I kristalleri eklenerek tamamen çözününceye kadar beklenir.

3.3.6. Laktofenol Pikrik Asit Çözeltisi

Laktik asit	10.0 ml
Fenol	10.0g
Gliserol	20.0 ml
Distile su	10.0 ml

Önce fenol ısıtılarak eritilir, su ilave edilir. Daha sonra üzerine laktik asit ve gliserol ilave edilir.

3.4. Besiyerleri

3.4.1. Bromcresol Purple Dextrose Broth (BCP)

Dextrose	10.0 g
Et ekstraktı	3.0 g
Pepton	5.0 g
BCP çözeltisi(%1.6 alkolde)	2.0 ml
Distile su	1.0 l

Bileşenler eritilir, pH 7.0'ye ayarlanır,121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

3.4.2. EC Broth

Triptose (veya tripticase)	20.0 g
Laktoz	5.0 g
Safra tuzu (Oxoid l56 veya eşdeğeri)	1.5 g
Dipotasyum fosfat	4.0 g
Potasyum fosfat	1.5 g
Sodyum klorür	5.0 g
Distile su	1.0 l

Bileşenler çözülür, pH 6.8-6.9'a ayarlanır. İçerisinde durham tüpü bulunan deney tüplerine 10'ar ml dağıtılır, 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Otoklavın kapağını açmadan önce sıcaklığın 75°C'nin altına düşmesi beklenmelidir. Aksi halde Durham tüpünde hava kabarcıkları kalabilir.

3.4.3. MR-VP Besiyeri

Pepton	7.0 g
Glikoz	5.0 g
Dipotasyum fosfat	5.0 g
Distile su	1.0 l

Bileşenler çözüldükten sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası pH değeri 6.9 olmalıdır.

3.4.4. Glikoz Tripton BCP Broth ve Agar

Tripton	10.0 g
Glukoz	5.0 g
Bromcresol Purpur (%1'lik)	4.0 ml
Distile Su	1.0 l

Bileşenler çözüldükten sonra, pH 7.0'ye ayarlanır, 121°C 15 dakika sterilizasyon yapılır. (Bileşime %1.5 agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanır)

3.4.5. Sülfite Agar

Tripton	10.0 g
Sodyum sulfat	1.0 g
Susuz Demir Sitrata	0.5 g
Agar	20.0 g
Distile Su	1.0 l

Bileşenler çözüldükten sonra, pH 7.0'ye ayarlanır, 121°C 15 dakika sterilizasyon yapılır.

3.4.6. Skim Milk ; Yağsız Süt

Yağsız süttozu	10.0 g
Distile Su	100.0 ml

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan süt tozunun antibiyotik içermeyen sütlerden yapılmış ve yağı ayrılmış olması gerekir. Besiyeri 100 ml distile suda tam olarak eritilir, uygun kaplara dağıtılıp, otoklavda 115°C'da 10 dakika sterilize edilir.

3.4.7. Tryptone Water

Tripton	10.0 g
Distile Su	1.0 l

Bileşenler çözündükten sonra, pH'sı 6.9'a ayarlanır Tüplere 5'er ml dağıtılıp otoklavda 121°C 'da 15 dakika sterilize edilir.

3.4.8. Peptone Water

Pepton	5.0 g
Distile Su	1.0 l

Bileşenler çözündükten sonra, pH'sı 6.8'e ayarlanır Tüplere 5'er ml dağıtılıp otoklavda 121°C 'da 15 dakika sterilize edilir.

3.4.9. Ozmofil Maya Besiyeri

Fruktoz	200.0 g
Glikoz	200.0 g
Maya ekstraktı	10.0 g
Agar	10.0 g
Distile su	580.0 ml

Bileşenler ısıtılarak çözülür, otoklavda 110°C'da 10 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında Petri kutularına dökülür.

3.4.10. Ozmotolerant Maya Besiyeri

Fruktoz	300.0 g
Glikoz	300.0 g
Maya ekstraktı	10.0 g
Agar	10.0 g
Distile su	380.0 ml

Bileşenler ısıtılarak çözülür, otoklavda 110°C'da 10 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında Petri kutularına dökülür.