

# GIDALARDA MİKROBİYOLOJİK KALİTE KONTROLÜ

## 1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı zehirlenmelere sebep olan patojen mikroorganizmaların hastalığa neden olma mekanizmaları ve bu mikroorganizmaların gıdalardaki kontrolü üzerine birçok çalışma ve düzenleme yapılmıştır. Ancak alınan tüm önlemlere rağmen teknolojik olarak gelişmiş batı ülkelerinde bile gıda kaynaklı salgınlara rastlanabilmektedir. İnsanların sağlıklarını koruyabilmeleri için yeterli ve dengeli beslenmelerinin yanı sıra tükettikleri gıdaların insan sağlığını tehdit etmemesi ve güvenli olması da gerekmektedir. Endüstrileşme ile beraber hazır yemek ile beslenmeye karşı eğilimin son yıllarda artış gösterdiği görülmektedir. ABD, İngiltere ve Hollanda'da elde edilen istatistiksel verilere göre gıda kaynaklı hastalıkların %70'inden fazlası yemek veya servis hizmeti veren sektörlerle ilişkilendirilmektedir. Gıda zehirlenmesi; kontamine gıda ve/veya suyun tüketilmesi sonucu ortaya çıkan hastalıklara verilen genel bir isimdir. Günümüzde gıda kaynaklı zehirlenmeler birçok ülkenin önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Gıda maddelerinin hijyenik koşullarda üretilerek, hijyen zinciri bozulmadan tüketiminin sağlanması sağlıklı beslenmenin sağlanabilmesi için önemli bir kriterdir.

Gıdaların üretim aşamasından tüketiciye ulaşıncaya kadar yapılan işlemler zincirinde çeşitli kaynaklardan bulaşan mikroorganizmalar, uygun koşullar söz konusu ise hızla çoğalarak duyuşsal kalitenin bozulmasına, ekonomik kayıplara ve gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler. Bu süreçte hijyen zincirinin en önemli basamaklarından birini personel hijyeni oluşturmaktadır. Ayrıca, gıdaların üretim ve işlenmesi aşamalarında kullanılan kesme tahtaları, dilimleyici, karıştırıcı ve öğütücüler, işletmenin suyu, ortamın havası ile üretim koşullarında bulunmaması gereken çöpler, haşereler, kemiriciler ve ev hayvanları bulaşma kaynakları olarak karşımıza çıkmaktadır. Gıda satış noktalarında satışa sunulan ve hemen tüketilebilecek halde bulunan ürünler, tüketime hazır yiyecek/gıda olarak adlandırılmaktadırlar. Bu gıdalar; çiğ veya pişmiş, sıcak veya soğuk ya da yeniden ısıtma gibi bir ısı işlem olmadan tüketilebilir halde bulunmaktadırlar. Tüketime hazır gıdalar, doğrudan tüketildiği için pişirilerek içerisindeki mikroorganizmaların çoğu öldürülebilir gıdalara göre tüketici sağlığı açısından daha risklidirler. Bu gıdalar çoğunlukla tüketilinceye kadar soğukta muhafaza edilerek çoğu bakterinin inhibisyonu sağlanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada tüketime hazır gıdalardan izole edilen patojen mikroorganizmalar arasında verositotoksin üreten *Escherichia coli* (VTEC), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter* spp. türlerinin yer aldıkları bildirilmektedir. Birçok ülkede birinci sıradaki gıda kaynaklı

hastalık etmenlerinin *Salmonella* ve *Campylobacter* türleri olduğu belirtilmektedir. Ancak, ülkeler arasında insanların beslenme alışkanlıklarından ileri gelen farklılıklar olduğu da vurgulanmaktadır. Tüketime hazır gıdalar aracılığı ile meydana gelen gıda kaynaklı salgınlardaki patojen etkenlerin incelendiği birçok çalışma mevcuttur.

### **1.1. Mikroorganizmalar Hakkında Genel Bilgiler**

Mikroorganizmalar, çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük ve tek hücreli canlılardır. Bakteriler, mayalar, küfler, algler ve protozoa temel mikroorganizmalardır. Şapkallı mantarlar, yosunlar, likenler de aslında mikroorganizmalardır, ancak bunlarda farklılaşmış hücreler ve/veya birleşmiş hücreler olduğu için normal bitkilere benzer görünümündedirler. Bakteri ve mayalarda bu şekilde birleşmiş veya farklılaşmış hücreler yoktur.

Tek bir hücreden milyonlarcası çoğalarak koloni denilen ve çıplak gözle görülebilen yapılar oluşur. Ekmeğin, yoğurdun üzerindeki küfler, reçelin üzerindeki mayalar, sirkenin üzerinde toplanan sirke anası, vücutta çıkan iltihaplı sivilceler ve çıbanlar aslında koloni denilen yapılardır.

Dünyada 500.000 - 6.000.000 arasında farklı türde mikroorganizma olduğu sanılmaktadır. Bugüne kadar bunların %5 'inden daha azı olduğu kabul edilen 3500 bakteri, 90.000 fungi (maya, küf, şapkallı mantar), 100.000 protist (alg ve protozoa) tanımlanabilmiştir.

### **1.2. Mikroorganizmaların Yarar ve Zararları**

Mikroorganizmaların pek çok yararı vardır.

- Çeşitli gıdalar mikroorganizmalar ile elde edilir (yoğurt, kefir, kıyma gibi süt ürünleri, tüm alkollü içecekler, sirke, boza, uzak doğu kökenli soy sos gibi çeşitli ürünler, ekmeğin mayalanması, tek hücre proteini).

- Çeşitli endüstriyel ürünler mikroorganizmalar ile elde edilir (alkol, aseton, butanol vs).

- Biyolojik atık su arıtımında mikroorganizmalar kullanılır, buradan çıkan çamur değerli bir organik kütledir.

- Biyogaz reaktörlerinde mikroorganizmalardan yararlanılır.

- Maden yatakları mikroorganizmalar ile ıslah edilir.

- Biyolojik gübre, biyoinsektisid üretiminde mikroorganizmalar kullanılır.

- Doğadaki C, N, P, S gibi çevrimlerde mikroorganizmalar önemlidir.

- Genetik pek çok çalışmada mikroorganizmalardan yararlanılır.

Buna karşın mikroorganizmalar insanları, bitkileri ve hayvanları hastalandırırlar ve öldürürler, gıdaları bozarak ekonomik kayıplara neden olurlar.

Mikroorganizmaları yararlı ve zararlı olarak sınıflandırmak mümkün değildir. İnsanların denetim altında olmak üzere yararlı olan bir mikroorganizma başka bir yerde zararlı olabilir. Örneğin sirke yapımında kullanılan bakteri şarap fabrikasına bulaşırsa işletmenin tüm şarabı sirke haline gelir ve büyük ekonomik kayıp yapar. Genetik çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalardan bazıları hastalık yapma (patojen) özelliği taşırlar. Küflü peynir yapımında kullanılan küfler beyaz peynire bulaşırsa hiç bir sağlık sorunu olmaz ancak beyaz peynir küflenmiş görünümde olacağı için tüketici tarafından alınmaz, ayrıca yasal olarak bu peynirin satılması da mümkün değildir.

### **1.3. Mikroorganizmaların Çoğalması**

Mikroorganizmalar bitkiler ve hayvanlara göre çok hızlı şekilde ve 2'ye bölünerek çoğalır. Genel olarak küfler bakteri ve mayalara göre daha geç çoğalırlar. Bakteriler arasında 8 dakikada bir sayısını 2'ye katlayanlar vardır. Buna göre 1 bakteri 8 dakika sonra 2; 16. dakikada 4 ; 24. dakikada 8 ; 36. dakikada 16... olmak üzere 4 saat sonra sayısını bir milyanın üzerine çıkarır. Her bakteri bu kadar hızlı gelişmez, ancak gıdaları ilgilendirenlerin çoğu için 1 adetten 1 milyona çıkma süresi 7-8 saat kadardır. Kuşkusuz başlangıç sayısı ne kadar fazla ise belirli bir sayıya örneğin 1 milyona ulaşma süresi o denli kısaldır. Bakterinin ideal sıcaklık, su, asitlik, oksijen durumunda ve yeterli besin maddesi varlığında 2'ye bölünme süresinin 24 dakika olduğunu varsayalım. Buna göre 1 bakteri 8 saat sonra 1 milyona (1.048.576) ulaşacaktır. Aynı bakteri başlangıçta 1 adet değil de 16 adet varsa aynı sayıya ulaşması için gereken süre bu kez altı buçuk saate düşecektir.

Burada değinilen besin maddeleri, sıcaklık, su, ortam asitliği ve oksijen gibi gelişmeyi doğrudan etkileyen tüm faktörlerin optimum değerlerde olması halinde geçerlidir. Bu faktörlerin bir ya da daha fazlasının optimumdan sapması ile gelişme hızında azalma olur.

Yukarıda verilen örnekte bakterinin 2 'ye bölünme süresi ideal koşullarda 24 dakika olarak verilmiş idi. Örneğin bakterinin bulunduğu ortamı biraz soğutarak 2 'ye bölünme süresi 30 dakikaya çıkartılırsa 1 adet bakterinin 1 milyona erişmesi için gereken süre bu kez 10 saate çıkar. Sıcaklık biraz daha düşürülüp 2 'ye bölünme süresi 60 dakikaya çıkartılırsa bu kez 1 bakterinin 1 milyona erişmesi için 20 saat süreye gerek vardır. Buzdolabı sıcaklığı ne kadar düşer ise gıdaların bozulma süresinin o denli uzamasının nedeni budur.

Gıdaların korunmasında yukarıda değinilen sıcaklık, su, ortam asitliği ve oksijenden ya da diğer gazlardan sıklıkla yararlanır. Örneğin vakum ambalajda ve soğukta saklanan gıdaların bozulması daha uzun süre alır. Bilindiği gibi gıdaların bozulması mikroorganizma sayısının artması ve belirli bir değere ulaşması ile olur. Söz konusu sayıya ulaşması için mikroorganizmaların gelişmesi ne kadar engellenirse bozulma süresi o denli uzatılabilir.

Çeşitli kimyasal maddeler kullanılarak da gıdalarda bulunan mikroorganizmaların gelişmesi yavaşlatılabilir ya da durdurulabilir. Bu konuda asit, tuz, şeker gibi maddelerin dışında pek çok kimyasal madde koruyucu olarak kullanılabilir. Bunlar arasında en yaygın olanlar sorbat, benzoat, nitrat ve nitrittir.

Bir gıdanın üretiminde mikroorganizmanın gelişmesi için en uygun koşullar sağlanırken, tersine olarak mikroorganizma faaliyeti istenmiyorsa sırası ile mikroorganizmanın öldürülmesi hedef alınır, bu başılamıyor ise gelişmenin durdurulması, bu da gerçekleştirilemiyor ise gelişmenin durdurulması amaçlanır. Bu seçimlerde gıdanın çeşidi bağlayıcı rol oynar. Aşağıda çeşitli örnekler verilmiştir.

- Süt amaca uygun olarak sterilize veya pastörize edilir. Pastörize sütte başta tüberküloz olmak üzere hastalık yapan bakterilerin tamamı ile bozulma yapan bakterilerin büyük çoğunluğu öldürülür. Ancak kalan bakteriler zamanla çoğalarak sütü bozarlar. Yukarıda açıklandığı şekilde süütün buzdolabında saklanması nereden bakterilerin ikiye bölünme süresini uzatarak bozulmasını geciktirmektir. Bu durumda bu gibi gıdalar için depolama sıcaklığı ne kadar düşük ise bozulma için geçen süre o denli uzun olur. Ama pastörize içme sütü gibi gıdalar bu amaçla dondurulmazlar. Steril (UHT; uzun ömürlü) sütte ise tüm mikroorganizmalar özel bir ısı uygulaması ile öldürülürler. Dolayısı ile bu süütün mikroorganizmalar ile bozulması beklenmez ve bu sütle marketlerde oda sıcaklığında depolanır. Bununla beraber, kutu açıldıktan sonra sterillik bozulacağı için bu aşamadan sonra artık pastörize edilmiş süt gibi kabul edilip, mutlaka buzdolabında korunmalı ve kısa sürede tüketilmelidir. Bir diğer deyiş ile pastörize sütte zaten pastörizasyona dirençli bazı bakteriler canlı kalırlar, açılmış steril süte ise dışarıdan bakteriler bulaşır ve bu ikisi aynı duruma gelir.

- Sebzeler dondurulabilir, kurutulabilir, sterilize (konserve) edilebilir. Konserve sebzeler steril süt gibi düşünölmelidir. Ambalajı açılıncaya kadar oda sıcaklığında, sonra buzdolabında korunmalıdırlar.

- İçme suyu filitreden geçirilebilir ve/veya ultraviyole ışını ile ve/veya ozon ile sterilize edilebilir, ya da doğrudan kaynak suyu olarak pazarlanabilir.

- Yoğurt ve peynire hiç bir uygulama yapılamaz. Sadece hammadde olan süt pastörize edilir. İşlem sırasında gelişen asitlik ve özellikle bakterilerin salgıladıkları bir takım

antibiyotik benzeri maddeler bu ürünleri belirli bir şekilde korur. Burada amaç örneğin kaşar peynirine küf bulaşmasının elden geldiği kadar önlenmesidir.

- Baharata ışınlama dışında hiç bir şey yapılamaz, ışınlama ülkemizde serbest bırakılmıştır.

- Asitli veya gazlı tüm gıdaların (meyve suları, gazlı meşrubatlar, bira) pastörize edilmesi yeterlidir. Bunlar asitli oldukları için burada sadece aside dirençli mikroorganizmalar bulunur. Bunlar da 80-90 °C 'da 1-2 dakikada rahatlıkla öldürülebilirler.

#### **1.4. Mikrobiyolojik Kontrolün Önemi**

Kimi gıdalar tüm mikroorganizmalardan arındırılmış bir şekilde üretilip pazarlanırlar. Mikroplardan arındırma genellikle 100 °C üzerindeki sıcaklıklarda ısıtma ile sağlanır. Uzun ömürlü süt, sebze konserveleri ve salça, et ve balık konserveleri gibi orijinal ambalajında oda sıcaklığında depolanan ürünler bu tip gıdalara örnektir. Bu tip gıdalarda canlı tek bir mikroorganizma dahi kalırsa çoğalarak ürünü bozar gıdayı tehlikeli hale getirir.

Yine oda sıcaklığında depolanan gıdalardan meyve suları, reçeller, marmelatlar, meyve konserveleri, kolalı içecekler ve diğer meşrubat ile bira 100 °C altında ısıl işlem ile korunur. Bu ürünlerde asitlik yüksek olduğu için ısıl işlem ile sadece ürünü bozabilecek ve insanlarda hastalık yapacak mikroorganizmaların imhası hedef alınır. Bu ürünler tümüyle steril değildir. İçlerinde az sayıda mikroorganizma bulunabilir. Ancak bu mikroorganizmalar gelişerek ürünü bozamaz. Bir diğer deyiş ile canlı kalmak ile çoğalmak farklı kavramlardır.

Bazı gıdalarda ise belirli sayılarda mikroorganizma bulunur. Ekmek, bisküvi, pastörize içme sütü, tereyağı, peynirler, pastalar, dondurulmuş meyve ve sebzeler, kuruyemişler, baharat, meyve ve sebze kuruları ile evde ya da lokantada yapılan tüm yiyeceklerde mikroorganizmalar bulunur. Bunlardan baharat, kuru yemişler, bisküviler, çikolata ile meyve ve sebze kuruları oda sıcaklığında, pastörize içme sütü, pastalar, peynirler gibi daha nemli gıdalar normal buzdolabı sıcaklığında, donmuş gıdalar ise derin dondurucuda saklanır. Bunlardan donmuş gıdalar derin dondurucuda, kurutulmuş gıdalar oda sıcaklığında uzun süreli korunabilirlerken, normal buzdolabı sıcaklığında korunan tüm gıdalar kurutulmuş ve dondurulmuş olanlara göre daha çabuk bozulurlar.

Bazı gıdalar ise mikroorganizmalar ile yapılır. Yoğurt bunlara en tipik örnektir. Çay kaşığının ucu kadar (1 gram) yoğurtta 100.000.000 kadar canlı bakteri vardır. Orta boy (100 g) bir kase yoğurt tüketildiğinde vücuda 10 milyar canlı bakteri girer. Boza ve kefir bu gibi gıdalara diğer örneklerdir.

Gıdalarda bulunan mikroorganizmaların bir kısmı (yoğurtta olduğu gibi) sağlık açısından yararlı olmakla birlikte bazıları insanları hastalandırır ve hatta öldürürler. Aşağıda temel bilgi olmak üzere koli basili, yüksek risk taşıyan gıdalar, hastalık riski ve oranı ile güvenli gıda üretimi için altın kurallar verilmiştir.

### **1.5. En Yüksek Risk Taşıyan Gıdalar**

Türkiye 'de gıdalara bağlı hastalanma ve ölümler için en yüksek neden doğadan toplanıp yenilen şapkallı mantarlardır. Normal kültür mantarları ise asla zararlı değildir. Şapkallı mantar zehirlenmeleri dışında ekşimik peyniri, mutfaklık tereyağı, özel olarak küflendirilmiş olanların dışında doğal olarak küflenmiş peynirler, çiğ kremadan yapılan pasta, döner vb. gıdaların yanına verilen garnitür salata gıda mikrobiyolojisi açısından en tehlikeli gıdalardır. Bunlara ilaveten ev tipi sebze konserveleri de tehlikeli olabilmektedir.

- Ekşimik peyniri: Peynir yapıldıktan sonra arta kalan peyniraltı suyu kaynatılarak lor peyniri yapılır. Bu çerçevede lor peyniri sağlıklı bir peynirdir. Pastörize edilmiş süte zararsız organik asitler ilave edilerek asitlik artırılır, bu süt ısıtıldığına çöker. Bu şekilde elde edilen çökelek peyniri de sağlıklı bir üründür. Buna karşın süt fabrikasına geldiğinde bakterilerin çoğalması sonunda asitliği yükselmiş sütler pastörize edildiğinde çöker. Süt fabrikasının hiç bir işine yaramayacak bu bozulmuş sütlerden hafifçe ısıtılarak ekşimik peyniri yapılır. Bu peynirde her türlü mikroorganizma bulunur. Bir diğer deyiş ile çökelek peynirinde sütün asitliği kontrollü olarak yükseltilir, ekşimikte ise süt asitliği bakterilerin kontrolsüz gelişmesi sonunda artmıştır, asitliği yüksek olan süt ısıtıldığında çöker. Açık semt pazarlarında lor peyniri adıyla satılan peynirlerin büyük bir çoğunluğu ekşimik denilen peynirdir. Bu peynir genellikle böreklerde kullanılır. Börek yapılırken pişirme sıcaklığı ise bu peynirde bulunan istenmeyen ve hastalık yapıcı mikroorganizmaları öldürmeye yetmez. Fiyatı düşük olduğu için tercih edilir. Ancak her hangi bir pastörize sütün 1 litresine yarım çay bardağı limon suyu ilave edilerek kaynatılır ise süt kesilir, basit bir tel süzgeçten süzülerek (istenirse kestirmeden önce tuz ilave edilerek) çok daha ucuz ve çok daha sağlıklı çökelek peyniri evde de yapılabilir.

- Mutfaklık tereyağı: Pastörize (kahvaltılık) tereyağı pastörize edilmiş süttten veya pastörize edilmiş kremadan yapılır. Oysa mutfaklık tereyağı tümüyle çiğ süttten ve pastörize edilmemiş kremadan yapılır. Ucuzdur. Mutfaklık tereyağı üreten firmalar "zaten bu mutfaklıktır, doğrudan ekmeğe sürülüp yenmez, yemeklere ilave edilir. Pişerken de mikropları ölür" şeklinde bir savunma içindedirler. Oysa; ucuz olduğu için pek çok kişi bunu kahvaltılık tereyağı gibi de kullanır, pilavın üzerine sadece eritilip ilave edilir. Çiğ kremadan

yapılan yaş pastalar da aynı şekilde tehlikelidir, pastacılar da "krema pişirilir ise ondan iyi pasta olmaz" şeklinde bir görüş vardır. Son zamanlarda modern pastaneler krema yerine şanti denilen endüstriyel bir ürün kullanarak bu sorunu ortadan kaldırmışlardır.

- Küflü Peynir: Rokfor, kamambert gibi bazı özel olarak küflendirilmiş peynirlerin dışında doğal olarak küflenmiş peynirlerde risk çok yüksektir. Özellikle olgun kaşarlarda küf yaygındır. Hatta halk arasında küflü peynirin makbul olduğu görüşü vardır. Kanseri riski vardır. Küflü kısmın kesilip atılması yeterli değildir. Küfler toksin oluşturur, bu zehir peynirin iç kısmına kadar işler. Sadece küflü kısmın atılması yeterli olmaz. Daha büyük tehlike küflü fındık ve fıstıkta vardır.

- Garnitür Salata: Ayaküstü yemek yenilen yerlerde (fast food) ve çeşitli kebabçılarda döner, adana vb. yemeklerin yanında verilen garnitür salata en tehlikeli gıdalar arasındadır. Bu tip yerlerde çoğunlukla salatalar iyi yıkanmamaktadır. Salatalar ise lağım suyu ile sulanma tehlikesine açıktır. Bu tip yerlerde yemek ve yanında salata yenilmesi gerekli ise yanında ayran veya su değil asitli meşrubat tercih edilmelidir. Çünkü bu tip gıdalarda bulunan hastalık yapıcı bakterilerin büyük çoğunluğu asit ortamlara dirençli değildir. Etli gıdalar midenin asidini düşürür, hastalık yapıcı bakteriler midenin düşük asitli ortamından geçerek bağırsağa ulaşır burada çoğalır ve hastalık yaparlar. Kuşkusuz ülser gibi mide rahatsızlıklarından şikayetçi olanlar asitli meşrubat içemeyeceklerine göre bu gibi iyi yıkandığından emin olmadıkları salataları yemekten kaçınmalıdırlar.

- Ev Konserveçiliği Ürünleri: Ev konserveçiliği ürünlerinden sebze konserveleri yeterli ısı işlem görmezlerse dünyanın en tehlikeli biyolojik zehri olan botulin oluşabilir. Ev konserveçiliği ile yapılmış sebze konserveleri tüketilmemeli, veya mutlaka kaynatıldıktan sonra tüketilmeli, ancak asla bezelyede olduğu gibi pişirilmeden, örneğin rus salatasına katılmamalıdır. Evde yapılmış meyve konserveleri tehlikeli değildir. Endüstriyel olarak üretilmiş sebze konservelerinde böyle bir tehlike yoktur.

## **1.6. Hastalık Riski ve Oranı**

Yukarıda bahsedilen konulara göre her gün on binlerce kişinin hastalanması ve onlarcasının ölmesi beklenirken gerek hastalık, gerek ölüm o denli yüksek görülmemektedir. Ancak durum görüldüğünden çok farklıdır. Ortalama olarak Türkiye 'de insanların yılda 3 kez gıda kaynaklı mikrobiyolojik zehirlenmeye maruz kaldıkları ve zehirlenmelerin sonunda çok basit ishal veya 1 hafta işe gelemeyecek kadar ağır ishal, kusma ve ateş ile karşılaştıkları kabul edilmektedir. Türkiye'nin nüfusu 80 milyon kabul edilirse basit bir hesap ile her gün yarım milyon insan çeşitli düzeylerde hastalanmaktadır.

## 1.7. Güvenli Gıda Üretimi için Altın Kurallar

Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation; UN-WHO) tarafından yayımlanan "Güvenli Gıda Üretimi İçin Altın Kurallar" adlı bildirgenin tercümesi aşağıda verilmiştir. Bu kuralların çok ilkel toplumlar için hazırlanmış olduğu ilk bakışta anlaşılmaktadır. Bununla beraber tercümenin yapıldığı kaynakta konu ile ilgili olarak İngiltere, Peru, Japonya, Singapur, Brezilya, İspanya, ABD, Tayland 'dan örnekler verilmesi nedeni ile bu metin ek olarak aşağıda verilmiştir.

-Güvenlik için işlem görmüş gıdaları seçin.

Her ne kadar çeşitli meyve ve sebzelerde olduğu gibi çoğu gıdalar taze halde iken en iyi doğal konumda olmalarına rağmen bazıları işlem görmemiş bazıları güvenli değildir. Örneğin çiğ süte göre her zaman pastörize edilmiş süt alınmalıdır. Alışverişte akılda tutulması gereken husus gıdanın işlenmiş olması gıdanın güvenliğini ve depolama ömrünü uzattığıdır. Salatalar gibi çiğ yenilen gıdalar yeterli bir yıkama gerektirir.

-Gıdayı doğru pişirin.

Tavuk, et, çiğ süt gibi bazı gıdalar sıklıkla hastalık yapıcı bakterilerle bulaşmıştır. Doğru pişirme bu patojenleri öldürür. Ancak gıdanın her bölgesinde sıcaklığın 70 °C 'a ulaşması gerektiği unutulmamalıdır. Pişirilmiş tavuklarda kemiğe yakın yerler halen çiğ ise bu tüketilmemeli ve tekrar pişirilmelidir. Donmuş et, tavuk, balık, ürünleri pişirilmeden önce çözülmelidir.

-Pişirilmiş gıdalar hızla tüketilmelidir.

Pişirilmiş gıdalar oda sıcaklığına soğutulduğunda canlı kalmış olanlar veya dışarıdan bulaşanlar hızla çoğalmaya başlarlar. Bekleme süresi uzadıkça risk artar. Tam güvenlik için pişmiş gıdalar yenilme sıcaklığına indiğinde derhal tüketilmelidir.

-Pişmiş gıdalar dikkatli saklanmalıdır.

Eğer gıda daha sonra tüketilmek üzere pişirilmiş ise sıcak ortamda (60 °C üzerinde veya civarında) ya da soğuk ortamda (10 °C altında veya civarında) korunmalıdır. Bu sıcaklıklar gıdanın 4-5 saat süreli depolanması için geçerlidir. Bebekler için pişirilen gıdalar kesinlikle depolanmamalıdır. Gıda kaynaklı pek çok hastalığa neden olan genel bir hata büyük kaptaki pişirilen sıcak yemeğin buzdolabına konulmasıdır. Aşırı doldurulmuş buzdolabında



pişirilmiş gıdalar yeterli sürede gerektiği gibi soğutulamaz. Gıdanın merkezi 10 °C üzerinde uzun süre kalırsa mikroplar hızla çoğalır ve hastalık yapacakları düzeye erişirler.

-Pişmiş gıdaların tekrar ısıtılması doğru yapılmalıdır.

Depolama süresinde gelişmiş olan mikroplara karşı en güvenilir koruma pişmiş gıdaları tekrar ısıtmaktır. Buzdolabında bekleyen pişmiş gıdalardaki mikropların ölmediği, sadece çoğalmalarının yavaşladığı unutulmamalıdır. Gıdanın her bölümünün sıcaklığı en az 70 °C olacak şekilde tekrar ısıtılması bu bakımdan önemlidir.

-Pişmiş gıdaların çiğ gıdalarla teması önlenmelidir.

Güvenli olarak pişirilmiş bir gıda, çiğ gıda ile hafif bir temas ile dahi bulaşık hale gelir. Bu çapraz bulaşma örneğin çiğ tavuk etinin pişmiş gıdalarla temasında olduğu gibi doğrudan olabilir. Ya da çiğ tavuğun parçalandığı tezgah ve bıçağın yıkanmadan pişmiş tavuğun parçalanmasında kullanılması gibi dolaylı bulaşma olur. Bu gibi durumlarda gıda tekrar pişirilmeyeceğine göre temiz gıda mikropların bulaşması ve çoğalarak hastalık yapması için potansiyel tüm riskleri taşır hale gelir.

-Eller sıklıkla yıkanmalıdır.

Gıdanın hazırlanmasına başlanılmadan önce ve her ara verişte (özellikle bebeğin altı temizlendiğinde, tuvalete gidildiğinde) eller iyice yıkanmalıdır. Çiğ balık, et, tavuk temizlendiğinde diğer gıdalarla uğraşmadan önce eller iyice yıkanmalıdır. Ellerdeki yaralar da pişmiş gıdayı bulaştırır. Köpekler, kuşlar ve özellikle kaplumbağalar gibi ev hayvanlarının tehlikeli patojenleri taşıdıkları ve bunların el ile gıdalara geçeceği de unutulmamalıdır.

- Mutfak yüzeyi titizlikle temizlenmelidir.

Gıdaların kolaylıkla bulaştığı göz önünde tutularak gıda hazırlamakta kullanılan tüm yüzeyler titizlikle temizlenmelidir. Gıdanın her parçasının, kırıntısının veya noktasının mikrop yuvası olabileceği unutulmamalıdır. Bulaşık materyal ile kirlenmiş elbiselerin her gün değiştirilmesi ve tekrar kullanılmadan önce kaynatılması gerekir. Döşemenin temizlenmesinde kullanılan bezler ayrı bir yerde tutulmalı ve sıklıkla yıkanmalıdır.

-Gıdaların böcekler, kemirgenler ve diğer hayvanlardan korunması gerekir.

Bu hayvanlar sıklıkla insanlarda hastalık yapan mikropları taşırlar. Bu nedenle gıdaların ağızlarının sıkıca kapalı şekilde depolanması gerekir.

-Temiz su kullanın.

Gerek içmek için gerek gıda hazırlamada temiz su kullanılmalıdır. Eğer su kaynağı konusunda bir şüphe var ise gıdaya katılmadan veya içecekler için buz yapmadan önce su kaynatılmalıdır. Özellikle bebeklerin içeceği suya çok dikkat edilmelidir.

### **1.8. Mikrobiyolojik Analizde Temel İlkeler**

Gıdalarda bulunan istenmeyen mikroorganizmaların analiz yöntemi gıdanın çeşidine, mikroorganizmanın ne denli istenmediğine ve gıda bulunması olası sayısına göre değişir.

Gıda maddesi sıvı ise doğrudan analize alınabilmekle beraber, katı gıdalarda analiz öncesi bir homojenizasyon işlemi zorunludur. Prensipten olarak patojen bakteriler belirli bir hacim ya da ağırlıkta var / yok testi ile aranırken, saprofitler sayılır.

Var / yok testlerinde genel yaklaşım 25 g ya da ml gıdada mikroorganizma varlığının belirlenmesidir. *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 gibi primer patojenler bu yöntemle aranır. Ulusal ve uluslararası standartların büyük çoğunluğu bu şekilde düzenlenmiş iken, gıda sanayii kendi kalite yaklaşımı ile örneğin *Salmonella* için 100 g gıdada analiz yapabilir ve böylece standart kaliteden 4 misli yüksek bir kalite standardı uygulamış olur. Bununla beraber hiçbir kuruluş 25 g ya da ml 'den daha az örnekte *Salmonella* aranması yoluna gidemez.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde *E. coli* genel olarak 1 g ya da ml gıdada bulunmamalıdır. Buna karşı içme ve kullanma sularında genel olarak 100 ml su örneğinde koliform grup bakteriler ve dolayısı ile *E. coli* bulunmasına izin verilmez. Su analizlerinde fekal kontaminasyon indeksi olarak 100 ml suda enterokok bulunmasın da izin verilmez.

Var / yok testlerinde bir diğer yaklaşım biyolojik stabilite testidir. Konserve sebzeler, konserve et ve balıklar, salça, meyve suyu, reçeller gibi gıdalarda UHT sütlerdeki gibi mutlak sterilizasyon gerekmez. Bu gıdalarda normal depolama koşullarında gelişebilecek mikroorganizma varlığı aranır. UHT sütlerde de aynı yöntemle sterilite testi yapılır.

Gıdalarda sayılan mikroorganizmalar genel olarak gıdalarda belirli düzeyde bulunmasına izin verilen gruplardır. Örneğin açıkta satılan gıdalar ile pastörize içme sütlerinde belirli sayıda mikroorganizma bulunmasına izin verilir. Bu tip gıdalarda toplam

bakteri, toplam maya ve küf, toplam koliformlar vb. mikroorganizmalar standart kültürel yöntemler ile sayılır.

Arama / sayma konusunda *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, ve özellikle *Clostridium perfringens* için tartışmalar bulunmaktadır. *C. perfringens* fekal kontaminasyon indeksi olarak ele alındığında *E. coli* gibi 1 g ya da ml gıdada bulunmaması gerekirken patojen olarak değerlendirildiğinde *S. aureus* ve *B. cereus* gibi 1 g ya da ml 'sinde 100 'den daha az bulunması istenmektedir. Buradaki değer standart analizde kullanılan koloni sayımı ile ilişkili olup, En Muhtemel Sayı (EMS) ya da membran filtrasyon yöntemleri ile analizin duyarlılığı yükseltilmektedir.

Gıdaların analizinde sıklıkla karşılaşılan bir sorun koliform analizidir. Hemen tüm ulusal ve uluslararası standartlarda koliform analizinin EMS yöntemi ile yapılması gösterilir iken, gıdanın katı besiyeri ile analizi ve izole edilen kolonilerin tanımlanarak sağlığa aykırı olup olmadığının araştırılması kayda değer ölçüde tartışmalara yol açmıştır. Burada koliform grup bakterilerin izin verilen sayıda olup olmaması önemlidir. Gıda kodeksi ile bu tartışmalar kayda değer ölçüde ortadan kalkmaktadır.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde en önemli hususlardan birisi de amaca uygun besiyeri seçimidir. Doğru seçilmeyen, hazırlanmayan, kullanılmayan besiyeri ile yanlış sonuçlar alınacağı kuşkusuzdur.

Analizin sonunda dikkat edilecek en önemli aşama ekimi yapılmış sterilize edildikten sonra yıkanmasıdır. Ekimi yapıldığı halde mikroorganizma gelişmesi olmayan tüp, erlen ve petrilere de bu kurala dahildir. Sadece rutin gıda kontrolünde homojenizat ve seyreltiler sterilize edilmeden yıkanabilir. Ancak burada homojenizat ve seyreltilerin ne kadar süre beklediği önemlidir.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde izole edilen mikroorganizmanın identifikasyonu gerekebilir. Bu aşamada her laboratuvarın makul büyüklükte bir kültür koleksiyonu bulunmalıdır.

Her laboratuvarda zaman içinde çeşitli analiz hataları yapılabilir. Hata yapılmaması önemli iken daha önemlisi hatanın belirlenmesi ve tekrarlanmamasıdır. Hata yapıldığında belirlenebilmesi için aykırı sonuçlara dikkat edilmesi, şahit örnek ile çalışılması, çeşitli laboratuvarlar arası çapraz kontrol yapılması gerekmektedir.

## 1.9. Yararlı Mikroorganizmalar

Gıda mikrobiyolojisinde yararlı bakteriler temel olarak gıdaların üretilmesinde kullanılan çeşitli mikroorganizmaları tanımlamaktadır.

Bilindiği gibi başta yoğurt, kefir, kıymız olmak üzere çeşitli süt ürünleri, boza üretiminde doğrudan mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır. Ekmeğin mayalanması, bira ve şarap yapımı yine mikroorganizmalar aracılığı ile olmaktadır. Bunlara ek olarak peynir ve tereyağı ile sucuk, turşu, zeytin vb. gıdaların yapımında mikroorganizmaların doğrudan yararı bulunmaktadır.

Çok genel bir tanımlama ile gıda üretiminde kullanılan mikroorganizmalara “starter kültür” adı verilir. Yine basit bir tanımlama ile starter kültür (ya da sadece starter veya kültür) “kontrollü koşullarda standart kalitede ürün elde etmek için gıda sanayiinde kullanılan mikroorganizmalardır”. Bu tarif altında yine basit olarak “yoğurt mayası, ekmeğin mayası, şarap mayası” starter kültürdür. Starter kültür, belirli bir amaca yönelik olarak kullanılır. Bazı gıdalarda işlevi asit geliştirmek iken, bazı gıdalarda aroma geliştirme esastır. Probiyotik ürünlerde olduğu gibi bazı gıdalarda temel işlev doğrudan sağlıklıdır.

Starter kültür tek ya da birden fazla mikroorganizma olabilir. Amaca göre hangi mikroorganizma ya da mikroorganizmaların starter olarak kullanılacağı değişir. Örneğin şarap, asidofiluslu süt gibi ürünlerde tek bir mikroorganizma kullanılırken, yoğurt, kefir gibi ürünlerde iki ya da daha fazla sayıda mikroorganizma vardır. Bununla beraber, şarap yapımında aynı mayanın (*Saccharomyces cerevisiae*) farklı suşları kullanılabileceği gibi amaca göre başka maya türleri de kullanılabilir.

Farklı mikroorganizmalar farklı substratlarda geliştiklerinde doğal olarak farklı metabolik ürünler ortaya çıkarırlar. Buna göre örneğin şarap mayası yoğurt yapılacak süte bulaşırsa yoğurtta istenmeyen tat ve kokular meydana gelir. Küflü peynir yapımında kullanılan küfler, beyaz peynire bulaşırsa beyaz peynirin tat ve kokusu küflü peynir gibi olur ancak gıda kontrolü açısından bu kez o ürünün pazarlanma olasılığı ortadan kalkar. Bu gibi nedenle her ürüne özgü starter kültür farklıdır. Bununla beraber aşağıda açıklanacağı gibi peynir yapımında doğrudan yoğurdun kullanımı da söz konusudur.

Mikroorganizmalar gıda üretiminde kullanılan pek çok hammaddede doğal olarak bulunur. Örneğin üzümde şarap yapımında kullanılan mayalar vardır. Buna bağlı olarak geleneksel yöntemde olduğu gibi üzüm suyu kendi halinde bırakılırsa zaten şarap olur. Burada elde edilen ürünün duyuşal özellikleri tümüyle üzüm ile gelen mayaların sayısı, hangi tür ya da türlerde oldukları, farklı türler var ise bunların birbirlerine oranı, mayaların aktivitesi, üzümde doğal olarak bulunan diğer tür mikroorganizmaların aktivitesi gibi koşullara bağlıdır.

Sonuçta duyuşal özellikleri çok yüksek bir şarap elde edilebileceği gibi, tersine olarak zayıf bir şarap da elde edilebilir.

Süt ürünlerinden peynir ve tereyağı da bu örneğe benzemektedir. Çiğ sütte doğal olarak bulunan laktik asit bakterileri çiğ süttten yapılan peynir ve tereyağına çok yüksek duyuşal özellikler kazandırabilecekleri gibi tersi de söz konusudur.

Buğün şarap halen büyük ölçüde geleneksel üretim yöntemi ile üretilirken, peynir üretiminde çiğ süttten geleneksel yöntemle üretim giderek azalmaktadır. Bunun en önemli nedeni toplumun sağlık ve kalite açısından bilinçlenmesidir. Buna rağmen başta peynir olmak üzere halen çiğ süt ürünlerinin tüketilmesine bağlı olarak yüksek sayıda bruselloz ve diğer hastalıklara da sıklıkla rastlanmaktadır.

Geleneksel yöntemle peynir yapımında basit olarak çiğ süt mayalama sıcaklığına getirilir, rennet ilave edilir, oluşun pıhtı kesilir, peyniraltı suyu süzölür, kuru tuzlama ya da salamurada bekletme yöntemi ile tuzlanır. Bu yöntemde çiğ sütte bulunan patojenlerin imhası sadece yine çiğ sütte bulunan laktik asit bakterilerinin oluşturdukları bakteriyosin ve diğer metabolitlere bağlıdır ve bu etki ancak belirli bir zaman süreci içinde gerçekleşir. Dolayısı ile çiğ süttten yapılan peynirlerin 90 gün olgunlaştırılması yasal bir zorunluk olmakla beraber, bu kurala ekonomik nedenlerle uyulmaması nedeni ile yukarıda değinilen hastalıklar meydana gelmektedir. Pastörize süte starter kültür ilave edilerek peynir 3 – 4 gün içinde pazarlanabilecek olgunluğa gelmektedir.

Patojenlerin imhası için en etkili yöntem ısıl işlemdir. Pastörizasyon ile bu patojenler büyük ölçüde öldürölür. Ancak bu işlem sırasında peynir ve tereyağı üretimine katkıda bulunan laktik asit bakterileri de imha olur. Bu durumda starter kültür, çiğ süttün pastörizasyonu sonunda imha olan yararlı bakteriler yerine dışarıdan ilave edilen mikroorganizma anlamına gelmektedir.

Peynir yapımında pastörize edilen süte starter kültür ilave edilmez ise asitlik gelişmeyeceği için elde edilecek peynirde kısa bir süre sonra pastörizasyon sırasında canlı kalmış sporlu bakteriler gelişerek hakim flora haline geçerler ve duyuşal açıdan peynir tüketilemeyecek hale geçer.

Tereyağı yapımı ise peynir yapımından farklıdır. Tümüyle fiziksel bir işlem olan tereyağı üretiminde doğal olarak çiğ süttten gelen laktik asit bakterileri ya da pastörizasyon sonrası ilave edilen starter kültür ürüne sadece duyuşal açıdan katkıda bulunur. Bu durumda pastörize süttten elde edilen kremaya starter kültür ilave edilmeden de tereyağı elde edilebilir.

Çiğ sütte peynir ve tereyağı için gerekli bakteriler bulunmakla beraber, yoğurt, kefir, kıymız için gerekli mikroorganizmalar son derece az sayıdadır ya da bazıları yoktur. Dolayısı ile bu ürünlerin yapımı için dışarıdan starter kültür ilavesi zorunludur. Çiğ süte bu mikroorganizmalar katılır ise yine bu ürünler elde edilir ancak yine çiğ süttten gelen flora zamanla gelişerek ürünü bozar. Dolayısı ile bu ürünlerin elde edilmesinde çiğ süte starter kültür katılması pratik olarak bir anlam taşımaz ve ister ev tipi ister endüstriyel üretimde süt pastörize edildikten sonra starter kültür ilave edilir. Benzer şekilde peynir ve tereyağı üretiminde de çiğ süte starter kültür katmanın bir anlamı yoktur.

Buna karşın endüstriyel ölçekli şarap ve sucuk üretiminde sırası ile üzüm suyu ve et pastörize edilmez. Starter kültür doğrudan ısıt işlem görmemiş hammaddeye ilave edilir. Şarap üretiminde doğal floranın etkisi kükürtleme ile ortadan kaldırılır, şarap mayası kükürde dirençlidir. Sucuk üretiminde ise bugün için başka bir pratik uygulama söz konusu değildir.

### **1.10. Saprotitler**

Gıdalarda doğal olarak bulunan bir diğer grup mikroorganizma ise saprotitlerdir. Bunlar “çürükçül” olarak da adlandırılırlar. Patojenlerden farklı olarak bunlar gıdalarda geliştiklerinde tat, koku, kıvam vb. bozuklukları ile varlıklarını ve geliştiklerini açıkça hissettirirler. Dolayısı ile bunlar genel olarak ekonomik kayıplara neden olurlar.

### **1.11. İndikatör Mikroorganizmalar**

İndikatör mikroorganizmalar gıda sanayiinde kurallara uygun olarak üretim yapıp yapılmadığının göstergesi olarak değerlendirilir. Hammadde, üretim teknolojisi, iyi ve doğru üretim uygulaması (GMP; Good Manufacturing Practice) konularında indikatör mikroorganizmalar yeterli bilgi verir. Bir diğer deyiş ile ve kısaca indikatör mikroorganizmalar kalitenin göstergesidir.

Bu aşamada indikatör mikroorganizmalar ile patojenlerin birbirine karıştırılmaması gerekir. Gıda kalitesi hakkında fikir elde etmek için aranan / sayılan bu grup mikroorganizmalar toplam bakteri, toplam maya ve küf, toplam koliformlar, fekal koliformlar gibi mikroorganizma gruplarıdır. Toplam bakteri içinde çok yoğun olarak (örneğin *Staphylococcus aureus* gibi) patojen bakteriler bulunsa bile bunlar analiz yöntemi uyarınca sadece toplam bakteri olarak değerlendirilir. Tersine olarak bir gıda maddesinin üretiminde kullanıldığı için yararlı olarak değerlendirilen bir mikroorganizma (örneğin, rokfor peyniri yapımında kullanılan *Penicillium roqueforti*) başka bir gıdaya (örneğin kaşar peynirine)

bulaşırsa yine indikatör mikroorganizma olarak toplam maya ve küf analizinde standartların üzerinde küfe rastlanacağı için o ürün bozulmuş olarak kabul edilir.

Hangi mikroorganizma gruplarının indikatör olarak ele alınacağı ile ilgili olarak farklı görüşler bulunmaktadır. Bir yaklaşıma göre indikatör mikroorganizmaların mutlaka dışkı kökenli olması gerekirken, bir başka yaklaşım her türlü mikroorganizmayı indikatör olarak kabul etmektedir. Bu metinde ikinci görüş benimsenmekte ve indikatör olarak tüm mikroorganizmalar değerlendirilmektedir. Son zamanlarda mikroorganizmalara ek olarak mikrobiyel gelişmeye bağlı ortaya çıkan laktik asit, diasetil, alkol gibi ürünlerin de mikrobiyel indikatör olarak değerlendirilmesi üzerinde durulmaktadır.

Gıda sanayiinin farklı işletmelerde o işletmeye özgü indikatör mikroorganizmalar üzerinde durulur. Örneğin tereyağı işletmesinde lipolitik mikroorganizma varlığı / sayısı önemli bir kalite kriteri iken, lipolitik bakterilerin örneğin meyve suyu endüstrisinde hiçbir önemleri yoktur. Benzer şekilde fekal kontaminasyon indeksi bakteriler pek çok gıda maddesi için önemli kalite kriteri iken, konserve sebzelerde bu bakterilerin aranması gereksizdir.

Gıda işletmeleri kendi kalite programları çerçevesinde hammaddeden başlayarak farklı mikroorganizmaları indikatör olarak belirleyebilir. Buna ilave olarak kamu kontrol kuruluşları tarafından belirlenen indikatör mikroorganizmalar da bulunur.

### **1.12. İndikatör Mikroorganizmaların Özellikleri**

Gıda endüstrisinde indikatör olarak seçilen mikroorganizmaların belirli özellikler taşıması gerekmektedir.

Öncelikle gıdalarda mikrobiyel kalite ile ilişkili bu mikroorganizmaların varlığı kolaylıkla ve hızla belirlenebilmeli ve sayılabilmeli, diğer mikroorganizmalardan ayrılabilmesi, gıdada bulunan doğal flora tarafından bu mikroorganizmaların gelişmesi engellenmemelidir.

Buna bağlı olarak toplam bakteri, toplam maya ve küf, toplam ozmofilik ve ozmotolerant mayalar, kseroofil küfler, toplam proteolitik bakteriler, toplam koliformlar vb. gibi farklı mikroorganizmalar yukarıda da belirtildiği gibi farklı gıdaların kalitesinin belirlenmesinde indikatör mikroorganizma olarak kullanılmaktadır.

Genel prensip olarak indikatör mikroorganizmaların patojen olmaması gerekirse de *Clostridium perfringens* istisnadır.

### 1.13. Fekal Kontaminasyon İndeksi

İndikatör mikroorganizmalar olarak en önemli grup fekal kontaminasyon indeksi bakterilerdir. Bunların varlığı gıdaya hammaddeden başlayıp gıdanın taşınmasına kadar bir ya da daha fazla aşamada doğrudan ya da dolaylı olarak lağım ile dışkı bulaştığının göstergesidir.

Fekal koliformlar, enterokoklar ve *Clostridium perfringens* tipik fekal kontaminasyon indeksidirler. Fekal koliformlar yerine yaygın olarak *E. coli* kullanılır. Bunlardan enterokoklar sularda fekal kontaminasyon belirlenmesi için diğerlerine göre daha iyi bir gösterge olarak kabul edilir.

Fekal kontaminasyon indeksi ve buna bağlı olarak gıda kalitesi üzerinde dikkat edilmesi gereken noktalar vardır.

Yukarıda da belirtildiği gibi indikatör mikroorganizmalar patojenler içinden seçilmemektedir. Burada öncelikle primer patojen olmayan bakteri *E. coli* tip 1 olarak tanımlanan bakteridir. Bu bakterinin bağırsaklarda vitamin sentezine katılması nedeni ile yararlı bir bakteri olduğu da açıktır. Bununla beraber, *E. coli* O157:H7 serotipinin bugün bilinen en tehlikeli gıda kaynaklı patojen bakteri olduğu da unutulmamalıdır. Benzer şekilde *E. coli* 'nin diğer serotipleri ve *Klebsiella pneumoniae* de insan ve hayvanlarda hastalıklara neden olabilmektedir.

İkinci olarak analiz edilen materyalde bağırsak kökenli olan bu bakterilerin varlıklarının gösterilmesi o materyalde yine bağırsak kökenli olan *Salmonella* ve *Shigella* gibi primer patojenlerin de mutlaka bulunacağı anlamına gelmemekte, sadece bir potansiyel tehlikenin olduğuna işaret edilmektedir. İnsan dahil olmak üzere her hangi bir sıcak kanlı hayvanın bağırsağında başta *E. coli* olmak üzere diğer fekal koliformlar da mutlaka vardır, ancak o bireyde *Salmonella* ve *Shigella* gibi yine bağırsak kökenli patojenler bulunmayabilir. Nitekim tümüyle sağlıklı insan ve diğer sıcak hayvanların bağırsak sistemlerinde bu gibi patojenler yoktur. Tersine olarak sağlıklı görülen bireylerin bağırsak sistemlerinde *Salmonella* ve *Shigella* gibi primer patojenlerin ve hatta *E. coli* O157:H7 serotipi bulunabileceği unutulmamalıdır.

Son olarak, bu bakterilerin analiz edilen materyalde bulunması bir hijyen eksikliğidir. Ancak, bu hijyen eksikliğini hammaddeden mi yoksa işletme koşullarından mı geldiği bugünkü teknoloji ile analiz edilememektedir. Örneğin, tarla koşullarında kuşların hammadde üzerine dışkılamaları pratik olarak ve kolaylıkla engellenemez. Bu durumda pek çok baharatta fekal kontaminasyon doğaldır. Tersine olarak, süt sağımında meme hijyeni ve sağım koşulları kontrol altına alınır ise hayvan dışkısının çığ süte bulaşması tümüyle önlenir. Bu durumda çığ sütte fekal koliform bulunmaması gerekir. Ancak ülke hayvancılık koşulları dikkate



alınırsa bu aşama göz ardı edilebilir. Burada dikkat edilmesi gereken husus “ülke hayvancılık koşullarının zorlamasıdır ve kontrol altına alınabilir” bir özellik olmasıdır. Aynı durum çiğ et için de geçerlidir. Oysa pastörize süttten yapılan peynir gibi bir üründe pastörizasyon sonunda tüm koliform bakteriler ölür. Dolayısı ile bu ürünlerde fekal koliformlara rastlanması sadece pastörizasyon sonundaki bulamadan kaynaklanır. Bunun temel sorumlusu ise işletmede çalışanların tuvalet sonrası asgari hijyene dikkat etmemeleridir.

#### **1.14. Patojenler**

Gıda mikrobiyolojisinde patojen ile kastedilen mikroorganizmalar bir düzine bakteri türü ile mikotoksijenik küflerden ibarettir. Gıdada bulunan ve insanlarda hastalık yapan mikroorganizmaların patojen olarak nitelendirilmesi için 2 temel koşul vardır.

Öncelikle mikroorganizma gıdada açıkça “bozuk” olarak nitelendirilemeyecek kadar az sayıda bulunduğu hastalık yapabilme özelliğinde olmalıdır. Buna göre saprofit mikroorganizmalar ile patojenler arasında farklılık vardır.

İkinci olarak, gıda mikrobiyolojisi doğrudan gıda işleme teknikleri ile ilişkili olduğu için gıdanın sadece taşıyıcı olduğu insan patojenleri ile ilgilenmez. Buna göre tifo, paratifo, brusella, şarbon, tüberküloz gibi patojenler gıda mikrobiyolojisi konuları dışındadır.

#### **1.15. Mikrobiyel Enfeksiyon ve İntoksikasyonlar**

En genel adıyla gıda zehirlenmeleri olarak bilinen ve gıdaların tüketilmelerinden kısa bir süre sonra mide ve barsak sisteminde farklı şiddette izlenen rahatsızlıklara mikrobiyel enfeksiyon ve intoksikasyonların yanı sıra pek çok başka faktör etkili olabilir. Aşırı yeme, alerji, toksik bitki ve hayvan dokuları, kimyasal zehirlenmeler, hayvan parazitleri de mikrobiyel enfeksiyon ve intoksikasyonun neden olduğu rahatsızlıklara benzer belirtiler verebilir. Halk arasında genel olarak gıda zehirlenmeleri olarak adlandırılan tüm bu rahatsızlıkların belirtileri çoğu zaman birbirine çok yakın ve benzer olup birbiriyle karıştırılabilir. Konumuz olan mikrobiyel enfeksiyon ve intoksikasyonlara mikroorganizmalar ve bunların metabolitleri neden olmaktadır. Gıdaların aracı olduğu mikrobiyel kökenli hastalıkları iki temel grupta incelemek mümkündür.

-Gıda kaynaklı enfeksiyonlar: Hastalık etmeni olan patojen mikroorganizmalar gıdalar üzerinde çoğalmış olarak vücuda alınırlar. Bunlar barsak sisteminde tutunarak yayılır ve yangıya neden olurlar. Bazıları da vücuda alındıktan sonra barsak sisteminde oluşturdukları toksinler ile hastalığa sebep olurlar. Gıdaların sadece pasif bir taşıyıcı olarak rol aldıkları ve patojenlerin çoğalmasına imkân tanımaksızın onları naklettikleri durumlar da söz konusudur.

Böyle patojenler ve bunların neden oldukları enfeksiyonlar, örneğin; *Mycobacter tuberculosis* ve tüberküloz hastalığı gıda kaynaklı enfeksiyonların kapsamı dışında kalmaktadır. Burada unutulmaması gereken nokta bu tür patojenlerin gıdalar üzerinde genellikle gelişmemeleridir.

-Gıda kaynaklı mikrobiyel intoksikasyonlar: Mikroorganizmaların gıdalar üzerinde oluşturdukları toksinlerin vücuda alınması sonucu görülen toksik etkilerdir. Mikroorganizmalar içerisinde bakterilerin neden olduğu intoksikasyonlar ile fungus toksinlerinin meydana getirdiği mikotoksikosis olaylarını ayrı olarak incelemek gerekir. Bakterilerin neden olduğu toksik zehirlenmelerde gıda üzerinde *Clostridium botulinum* ve *Staphylococcus aureus* tarafından üretilmiş olan toksinlerin vücuda alınması esas iken mikotoksikosis olaylarında fungus toksinleri olarak; aflatoksinler başta olmak üzere, Okratoksin A, patulin, rubrotoksin, izlanditoksin, zearalenon, T-2 toksin deoksinivalenol, stachybotrytoksin gibi daha birçok toksinin gıdalar ile vücuda alınması söz konusudur.

Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar ABD ve Avrupa dahil tüm dünyada önemli bir problem olarak görülmekle birlikte daima solunum yolu enfeksiyonlarına oranla ikincil bir öneme sahiptir. Bununla beraber, bu rahatsızlıkların en alt düzeye indirilmesi için verilen uğraşlara karşın enfeksiyon ve intoksikasyonların azalmaması hatta son yıllarda artış kaydetmesi gıda kaynaklı bu patojen ve toksinlerin gıdalarda her geçen gün daha güvenilir yöntemlerle ve doğru olarak belirlenmesini zorunlu hale getirmektedir.

Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan çok sayıda mikroorganizmadan sadece bazıları çok özel role sahiptir. Örneğin; *Salmonella* serotipleri, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, enterovirulent *E. coli*, *Campylobacter jejuni* ve *Listeria monocytogenes* gıda kaynaklı rahatsızlığa neden olan etmenlerin başında gelmektedir. *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*' nin toksin oluşturan suşları, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* 'lar, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* gibi bakteriler ise hastalıkların ara sıra ortaya çıkmasına neden olurlar. Bunlardan bazılarının hastalık etmeni oldukları da hala tartışma konusudur.

### **1.16. Gıda Kaynaklı Hastalık ve Zehirlenme Semptomları**

Gıdalar aracılığı ile insanlarda meydana gelen hastalık ve zehirlenme nedenleri çok çeşitlidir. Bunlar arasında doğrudan mikroorganizmalar ve toksinleri, mantar zehirlenmeleri, ağır metaller başta olmak üzere kimyasal zehirlenmeler, bitkilerin neden olduğu zehirlenmeler önem taşımaktadır. Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 'nün tahminlerine göre

rapor edilen gıda kaynaklı hastalık ve zehirlenmeler gerçek verilerin gelişmekte olan ülkelerde %1'i, gelişmiş ülkelerde ise %10'u kadardır ve bu raporların büyük çoğunluğu toplu zehirlenmeler ile elde edilmektedir.

Hastalık ve zehirlenmelerin ortaya çıkışında vücuda giren mikroorganizma veya toksin miktarı birinci derecede önemli olmakla beraber, kişinin genel direnci ve beraber alınan diğer gıdalar da hastalanma veya zehirlenmelerde etkili olmaktadır.

Risk grubu yüksek olarak tanımlanan hamileler, bebekler, yaşlılar ve özellikle immunolojik açıdan hasta olan kişilerde doğal olarak bu tip hastalanmalar ve zehirlenmeler çok daha fazla görülmekte, bunun dışında genel olarak kabul edildiği şekli ile basit bir nezle dahi bu tip hastalıkların etkisinin artmasına neden olmaktadır. Bununla beraber, çok istisna olmak üzere bir hastalığın başka bir hastalığın etkisini ortadan kaldırması da söz konusudur. Buna verilebilecek en tipik örnek, bir enfeksiyon sonucunda ishal olmuş kişinin vücuduna ilave olarak bir toksin girer ise ishalin etkisi ile toksinin bağırsakta emilmeden dışarı atılmasıdır.

Hastalık etmenini taşıyan gıda ile birlikte alınan diğer gıdaların etkisine en tipik örnekler ise özellikle et ürünlerinin mide pH 'sını yükseltmesi ve etmenin kolaylıkla geçmesine izin verilmesi, mayonez gibi yağlı gıdalarda yağ globülleri arasına mikroorganizmanın gizlenmesi ve aynı şekilde midenin düşük pH 'sından etkilenmemesidir.

### **1.17. Gıda Patojenlerinin Analizi (Standart Yöntemler)**

Gıdalarda bulunan patojen bakterilerin analizi genel olarak var/ yok testleri ile yapılır. Bu testler, analizi yapılacak olan 25 g(ml) gıdada aranan patojenin var olup/olmadığının kontrolüdür. Amaçlanan sonuç patojenin 25 g(ml) gıdada 0 sayıda olmasıdır. Sayı 0 değil ise ne olduğu önemli değildir. Ayrıca, var/ yok testlerinin uygulanış şekli, aranan patojen varsa sayısını ortaya çıkartmaya yönelik değildir. Aranan patojenin sayısının 1 ya da 5.000 ya da çok daha fazla olması var/ yok testleri için önemli değildir. Sonuç "var" olarak verilir.

### **1.18. Yok ne Demektir?**

Var/ yok testi ile yapılan mikrobiyolojik analizlerde aranan mikroorganizma bulunursa testin geçerliği açısından bir sorun yoktur. Ancak sonuç "yok" olarak elde edilirse; geçekten mi yok sorusu her zaman akla gelir.

Yöntemin kendisinden gelen yetersizlik ya da operatörün hatalı uygulamaları sonunda gerçekte "var" olan bir patojen analiz sonunda "yok" olarak bulunabilir. Bu, sahte (false) negatif sonuçtur.

Analiz edilen gıdada 1 kob/ 100 g *Salmonella* olduğunu varsayalım. Operatörün aldığı 25 g örnekte bu bakterinin olma olasılığı sadece %25'dir ve burada sahte negatif bir sonuç yoktur. Gıdalardaki patojen analizlerinde en büyük sorun, aranan bakterinin stres altında olmasıdır.

## 2. MİKROORGANİZMALARIN BESLENMESİ VE GELİŞMESİ

### 2.1. Mikroorganizmalarda Beslenme

#### 2.1.1. Besin Elementleri

Mikroskopik varlıklar olmakla birlikte, mikroorganizmalar da bir canlı olduğuna göre; bitki ve hayvanlar gibi gelişmiş canlılarda besin maddeleri ve beslenme ne denli önemliyse, bunlarda da aynı öneme sahiptir. İnsanlar için besin maddesi, **normal olarak gelişip vücudun fizyolojik faaliyetlerini yerine getirebilmesi için ilaç hariç yenilen ve içilen her şey olarak** tanımlanır. Bu tanıma göre günlük yaşamda önemli bir yeri olan ve canlı ağırlığın büyük bir bölümünü teşkil eden su da bir besin maddesidir. Gerçekten de herkesin bildiği gibi tüm canlı dokularda su büyük bir oran teşkil eder ve besin maddelerinin canlılar tarafından değerlendirilebilmesi için önce sulu eriyik haline gelmesi gerekir.

Su, mikroorganizmalar için de aynı öneme sahiptir. Ortamın su miktarı belirli sınırların altında olursa, mikroorganizmalar çoğalmalarını ve diğer hayatsal faaliyetlerini durdururlar. Örneğin, mantarlar % 12'nin, bakteriler ise % 20'nin altında olan su miktarlarında gelişemezler. Mikroorganizma gelişmesi için önemli olan ortamın serbest su miktarıdır. Mikrobiyolojik yönden bu durum daha çok su aktivitesi olarak ifade edilir ve suyun, İngilizce isminden **Wa** ile sembolleştirilir. Mikroorganizmaların gelişmesi için en uygun su aktivitesi 0.80'in üzeridir. Ancak 0.60'a kadar su aktivitesinde gelişebilenler olduğu gibi, en iyi gelişme gösterebilmesi için 0.90'ın üzerindeki su aktivitesini isteyen mikroorganizmalar da vardır.

Hücre sel maddelerin oluşturulması, yani sentezi ancak bu maddelere dönüştürülecek ve besin maddeleri olarak tanımlanan bileşik veya elementlerin varlığı ile mümkündür. Bu nedenle, ortamda yalnızca yeterli düzeyde su bulunması mikroorganizma faaliyeti için tek koşul değildir. Ayrıca, mikroorganizmanın gereksinimi olan tüm besin maddeleri de yeterli miktarda bulunmalıdır. Hatta, bu maddelerin miktarcasına yeterli düzeyde olmaları da yalnız başına bir anlam taşımaz. Aynı zamanda, bunların mikroorganizma hücreleri tarafından değerlendirilebilecek fiziksel ve kimyasal özelliklerde olmaları zorunludur. Diğer canlılarda olduğu gibi, mikroorganizmaların fazla miktarda gereksinim duyduğu maddeler **makro**

**elementler** olarak tanımlanır. Başta **karbon** ve **azot** olmak üzere, **oksijen, hidrojen, kükürt, fosfor, magnezyum, kalsiyum, potasyum** ve **demir** gibi elementler bu gruba girer. Mikroorganizmalar, bu elementler yanında çok az miktarlarda da olsa, bir seri diğer elementlere mutlak gereksinim duyarlar. Bu elementler, çok az miktarlarda kullanıldığı için mikro elementler veya iz elementler olarak tanımlanırlar. Mikroorganizmalar için bu grupta sayılan elementler ise **bakır, bor, çinko, klor, kobalt, mangan, molibden, nikel, silisyum, sodyum** ve **vanadyum**'dur. Mikroorganizmalar birinci gruptaki elementlere fazla miktarda gereksinim duyduklarından, bunların besiyerine yararlanabilecek durumda ve yeterli düzeyde ilavesi zorunludur. Ancak, ikinci gruptaki elementlerden özellikle çok az kullanılanlar, daha önce belirtilen makro elementlerde, kapkacakta veya suda bulaşık olarak bulunabildikleri veya havadan toz vs. ile ortama ulaşabilmeleri nedeniyle, bazı özel durumlar dışında ilaveleri gerekli olmayabilir. Ayrıca, bunların saptanması çok zor, yorucu ve pahalı olduğundan; hem bunlara gerek olup olmadığı, hem de mikroorganizmaların bu maddelere olan gerçek gereksinimlerinin saptanması özel yöntem ve önlemleri zorunlu kılar.

Tüm mikroorganizmalar hücre maddelerinin tamamını, bunları oluşturan yapı maddelerinden sentezleme yeteneğinde değildir. Diğer canlılarda olduğu gibi bunların bir bölümü de bazı yapı maddelerini ortamdan organik maddeler halinde hazır olarak alırlar. Bu tür maddelerin de besiyerine ilavesi gerekmektedir. Bu maddeler arasında bazı **aminoasitler, vitaminler** ve **purin bileşikleri** önemli yer tutar. Bu tür maddeler **gelişme faktörleri** veya **tamamlayıcı maddeler** olarak tanımlanır. Mikroorganizmalar gelişme faktörlerine karşı olan durumlarına göre iki önemli grup oluştururlar. Bir grup mikroorganizma gelişme faktörlerini kendileri sentezleme yeteneğindedirler ve bu maddelerin ortama hazır olarak ilavesine gerek göstermezler. Bunlar **prototrof** mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar. Bunun tersine, gelişme faktörlerini sentezleme yeteneğinde olmayıp, mutlaka dışardan ilavesini zorunlu kılan ikinci grup mikroorganizmalar **okzotrof** olarak ayrılırlar. Buradan da kolayca anlaşılacağı gibi, mikroorganizmaların besin istekleri önemli farklılıklar gösterir. Bazı mikroorganizmalar bir kaç tuz, glikoz ve sudan; hatta madensel maddeler ve sudan oluşan besiyerlerinde gelişirken, diğerleri çok sayıda makro elementler yanında, yine çok sayıda ve değişik türden iz elementlere ve gelişme faktörlerine gereksinim duyarlar. Birinciler kanaatkar, ikinciler ise aşırı istekli mikroorganizmalar olarak belirtilirler. Kanaatkar mikroorganizmalara toprak ve su bakterilerinden bazıları, algler ve bazı mantar türleri örnek verilebilir.

### 2.1.2. Besiyerleri

Mikroorganizmaların geliştirilmelerinde kullanılan besiyerleri bileşimlerine, fiziksel

durumlarına, elde olunuş kaynaklarına ve kullanılış amaçlarına göre çeşitli tiplere ayrılırlar. Aşağıda bunlara kısaca değinilecektir.

a- Besiyerlerinin, elde edilmesine göre **doğal ve yapay besiyerleri** olarak öncelikle ikiye ayrıldığını belirtmek gerekir. Örneğin, üzüm şırası, malt şırası, maya veya et özütü gibi bitkisel ve hayvansal ürünlerden veya mikroorganizmalardan elde edilen maddeler doğal besiyerlerdir. Bunların bileşimleri tam olarak bilinmez. Fakat, genel olarak bir mikroorganizmanın gelişip, faaliyet gösterebilmesi için hemen tüm besin elementlerini ve hatta gelişme faktörlerini içerirler. Yapay besiyerleri ise belirli anorganik tuzların, belirli miktarlarda tartılarak su ile çözündürülmesi ve bunlara yine belirli vitamin, aminoasit ve şeker gibi organik kaynaklı maddelerin belirli miktarlarda ilavesiyle hazırlanır. Böylece bileşimleri tam olarak bilinir. Çoğu hallerde çözücü sıvı olarak belirli pH derecelerindeki fosfat tamponu kullanılır. Bu besiyerleri üretiminde kullanılacak veya denemeye alınacak mikroorganizmanın isteklerine uygun olarak hazırlanabildiğinden; bileşimlerini kanaatkar veya aşırı istekli türlere veya suşlara göre ayarlamak mümkündür.

b- Besiyerleri, fiziksel özelliklerine göre **katı ve sıvı besiyerleri** şeklinde yine ikiye ayrılır. Daha önce belirtilen, doğal ve yapay besiyerleri katı veya sıvı durumda olabilir. Besiyerleri doğal olarak katı durumda olabilecekleri gibi (havuç, patates vb.), sıvı besiyerleri yapay olarak da katılaştırılabilirler. Bu amaçla jelatin ve agar kullanılır. Katı durumda kullanılmak istenen veya buna zorunluluk olması durumunda sıvı besiyerlerine kullanılış amacına bağlı olarak, % 15 jelatin veya % 1-2 oranında agar ilave edilip, sıcakta eritildikten sonra soğutulursa tüm ortam sertleşerek akışkan (sıvı) özelliğini kaybeder.

Katılaştırma vasıtası **agar**, bir tür tuzlu su alginden (**Gelidium** türleri) üretilen, karmaşık yapıda bir polisakkarittir. Yapıtaşları, ardışık olarak bağlanmış **D-galaktoz ve 3,6-anhidrogalaktoz**'dur. Agar yalnızca az sayıdaki bakterilerce yıkılabilir, yani mikroorganizmaların büyük çoğunluğu agara etkili olamaz. Besiyerlerine % 1-2 oranında katıldığında katılaştırma için yeterlidir. Bu oranda agar içeren besiyeri 100°C'ye ısıtıldığında agar çözünür ve sıvılaşır. Yaklaşık 45°C'nin altına ininceye kadar sıvıdır, bu sıcaklığın altında katılaştır ve bir daha 98°C'ye ısıtılıncaya kadar katılığını korur. Agarın tek olumsuz özelliği 4.5 pH'nın altındaki besiyerlerinde katılaşma özelliğini kaybetmesidir.

**Jelatin**, aslında hayvansal bir protein olup, hayvan kemik, boynuz, kıkırdak veya deri doku atıklarının su ile kaynatılması sonucu elde edilir. Üretim sırasında kollagen doku proteini glütin'e dönüşür. Toz veya plaka şeklindeki jelatinlerin farkları, içerdikleri glütin oranından kaynaklanır. Besiyerlerine %15-20 oranında katılır. Bu oranda jelatin içeren besiyerleri 26-30°C'de sıvı hale geçer. Bu nedenle, ancak 25°C ve daha altında çalışılan

sıcaklıklarda katılaştırma amacıyla kullanılabilir. 100°C üzerindeki sıcaklıklarda katılma özelliğini tümünden kaybeder. Proteolitik etkili mikroorganizmalar jelatini yıktığı için, daha çok proteolitik etkinin belirlenmesi amacıyla kullanılır.

c- Besiyerleri bileşimlerine göre **basit** ve **karmaşık** bileşimli (kompleks) besiyerleri şeklinde ikiye ayrılabilir gibi; tam bileşimli veya bileşimine dahil edilmeyen bir maddeden yoksun olarak da sınıflanabilir. Örneğin, nitrat ilavesi yapılmamışsa **nitratsız**, vitamin konmamışsa **vitaminsiz besiyeri** vb. gibi. Basit bileşimli besiyerlerine örnek olarak, kanaatkar mikroorganizmalar için hazırlanan ve yalnızca birkaç tuzla, glikoz içeren yapay besiyerlerini gösterebiliriz (Çizelge 2.1). Kompleks besiyerleri ise hazırlanmasında çok fazla sayıda ve değişik miktarlarda maddelerin kullanıldığı besiyerleridir. Bunların birçoğuna pepton ve maya özütü gibi maddeler de ilave edilir ve bu durumlarda tam bileşimleri de bilinmez.

Çizelge 2.1. Bileşimlerine göre besiyeri

Bileşime katılan maddeler	Kullanılan miktar	
	Basit	Karmaşık
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2-3 g/l	Pepton, maya özütü, et özütü ve tuzlar
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 -0 g/l	
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.25 g/l	
Sakkaroz	190.00 g/l	
Su	1.0 l	
pH= 3		

d- Besiyerleri, kullanılış amacına göre ise **genel besiyeri** ve **seçici besiyeri** olarak ayrılabilir. Genel besiyerinin bileşimi değişik mikroorganizmaların gelişmesine ve üretimine uygundur. Örneğin, maya suyu, peynir altı suyu, şıra vb. Seçici besiyeri, yetiştirilmesi istenen veya tersine belirli bir ortamda gelişmesi istenmeyen mikroorganizmalar için amaca uygun bileşimde hazırlanır ve böylece ortamda ya yalnızca belirli bir mikroorganizmanın gelişmesine izin verilir veya belirli bir mikroorganizmanın gelişmesi engellenir. Besiyerine bu özellik, belirli mikroorganizmanın gereksinim duyduğu madde ve gelişme faktörlerinin katılıp, katılmaması, pH'nın belirli mikroorganizmaya göre ayarlanması ve ayrıca gelişmeyi önleyici maddelerin (antibiyotik vs.) ilavesiyle kazandırılır.

e- Ayrıca besiyerleri, kullanılış amacına göre **spor besiyeri**, **indol besiyeri** vb. gibi kullanılacak test veya yöntem ismine veya bulucusunun adına göre de bir sınıflamaya tabi

tutulabilir. Son duruma örnek olarak **Rogosa, Hayward, MRS (De Man-Rogosa-Sharp)** besiyerleri verilebilir.

### 2.1.3. Mikroorganizmaların Beslenme Tipleri

Diğer canlılarda olduğu gibi önceleri mikroorganizmaların beslenmesinde de karbon kaynağı esas alınmış ve **ototrof** veya **heterotrof** beslenmeden söz edilmiştir. Bu ayırmda, enerji kaynağı olarak anorganik maddelerden yararlanan mikroorganizmalar için **ototrof**, hazır organik bileşiklerden yararlananlar için ise **heterotrof** tanımı kullanılmıştır. Fakat günümüzde sağlanan gelişmeler ve mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri hakkında elde edilen bulgulardan sonra, bu ayırımın mikroorganizmalarda beslenme şekillerini belirtmede yetersiz olduğu anlaşılmıştır. Bunu dikkate alan bilim adamları, mikroorganizmaları metabolik faaliyetlerinde kullandıkları enerji kaynağı ve elektron vericisine göre de beslenme tiplerine ayırmışlardır.

Buna göre, bir mikroorganizma gelişmesi için gerekli enerjiyi ışık enerjisinden sağlıyorsa **fototrof** beslenme tipine sahiptir. Algler bunların en tipik örneğini teşkil etmektedir.

Gelişme için gerekli enerji, ortamda bulunan besin maddelerinin oksido-redüksiyon tepkimeleri sırasında açığa çıkan kimyasal enerjiden sağlanıyorsa, bu durumda **kemotrof** beslenme tipi ortaya çıkar. Çok sayıda mantar ve bakterilerde bu tip beslenme baskındır.

Diğer taraftan, bir mikroorganizma elektron veya  $H^+$ -verici (donörü) olarak anorganik bileşikleri ( $H_2$ ,  $H_2S$ ,  $Fe^{++}$  vb.) kullanma yeteneğinde ise **litotrof** organik bileşikleri değerlendirebiliyorsa **organotrof** beslenme tipine sahiptir.

Ancak, mikroorganizmaların hepsi böyle tek bir değerlendirme şekliyle sınırlı kalmaz. Aynı zamanda, birden fazla tipten beslenme özelliği gösterenler de vardır. Örneğin, bir yandan gerekli enerjiyi ışık enerjisinden karşılarken, diğer taraftan elektron verici olarak anorganik bileşikleri değerlendirebilirler. Bu durumda **fotolitotrof** beslenme şekli ortaya çıkar. **Cyanobacter**'le, kükürt-purpur bakterileri bu tipte beslenme gösteren mikroorganizmalara örnek teşkil ederler. Benzer şekilde, bir mikroorganizma hem kimyasal enerjiden yararlanır, hem de anorganik elektron vericisi kullanabilir. **Nitrifikasyon** bakterilerinde görülen bu tip beslenme **kemolitotrof** beslenmedir. Yine benzer şekilde kemoorganotrof beslenen mikroorganizmalar da çoğunluktadır. Hatta, kimyasal enerji. anorganik elektron verici ve organik karbon bileşikleri kullanan ve böylece **kemolitheterotrof** beslenen mikroorganizmalara bile rastlanır. Bu tür kombine beslenme tipi örneklerini daha da çoğaltmak olasıdır. Örneğin, **fotoototrof**, **kemoototrof**,



**kemoheterotrof** vb. gibi. Hatta, bu özellik dikkate alınarak mikroorganizmaların sınıflamasını yapan bilim adamları bile vardır.

Yukarıda belirtilen ve mikroorganizmaların bağımsız beslenme özelliğine dayanan beslenme tiplerinden başka, bir mikroorganizmanın başka bir mikroorganizma veya canlı ile ortak yaşamından kaynaklanan beslenme tipleri de bulunmaktadır. Bir mikroorganizmanın başka bir mikroorganizma veya gelişmiş bir bitki veyahutta hayvanla ortak yaşamında, bu yaşam ortaklardan her ikisinin de yararına ise **simbiyoz** beslenme şekli ortaya çıkar. Bu beslenme şekline doğada en iyi örneği, mikroorganizmalar arasında mantar ve alglerin bir arada bulunduğu **likenler**, mikroorganizma ve bitkinin ortak yaşamı olan **nodozite** oluşumu teşkil eder.

Ortak yaşam, her iki ortağa gözle görülür herhangi bir yarar veya zarar vermiyorsa **komensal** beslenme veya yaşamdan söz edilir. Bu durumda, mikroorganizmalar ile insan veya hayvan ağız veya bağırsağındaki ortaklık durumu örnek olarak verilebilir. Bu ortaklıkta mikroorganizma besinlerini ve uygun diğer çevre koşullarını ağız veya bağırsakta bulur. Fakat bu ortaklık her iki tarafa da belirli bir yarar veya zarar getirmez.

Ortak yaşamda mikroorganizma, konukçu olan diğer canlının zararına bir beslenme gösteriyorsa, **parazit** beslenme tarzı ortaya çıkar.

Eğer mikroorganizma ölü doku üzerinde beslenmesini sürdürüyorsa **saprofit** tarzda beslenme gerçekleşiyor demektir.

## **2.2. Mikroorganizmalarda Gelişme ve Gelişme Koşulları**

Gözle görülmesi bile, mikroorganizmalar da bir canlı olduğuna göre, gelişip çoğalmaları ve faaliyet göstermeleri için yalnız başına besin maddelerinin verilmesi bir anlam taşımaz. Nasıl, gelişmiş canlılar besin maddelerinden başka, soğuk, sıcak, aydınlık, karanlık, hava ve nem gibi diğer çevre koşulları bakımından da bir takım isteklere sahiplerse; mikroorganizmalar da benzer isteklere sahiptirler. Yani, bunların gelişmeleri besin maddelerinden başka, diğer çevre koşulları tarafından da etkilenir ve iyi, istenen düzeyde bir mikroorganizma gelişmesini sağlamak veya yeterli düzeyde engellemek için, bu koşulların ve bunların mikroorganizmalar üzerine etkilerinin iyi bilinmesi gerekir. Çünkü, mikroorganizmaların çevre koşullarına karşı davranışları farklıdır. Bazı mikroorganizmalar çevre koşullarına oldukça duyarlıdırlar ve bunlar **şitenök** mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar. Çevre koşullarına duyarlılığı az olanlar ise **öryök** mikroorganizmalar grubuna ayrılırlar. Mikroorganizmaların gelişmelerine önemli etkide bulunan sıcaklık, pH veya ortamın asitlik veya kalemilik durumu, hava veya oksijen ve ışık gibi önemli etkenler **gelişme**

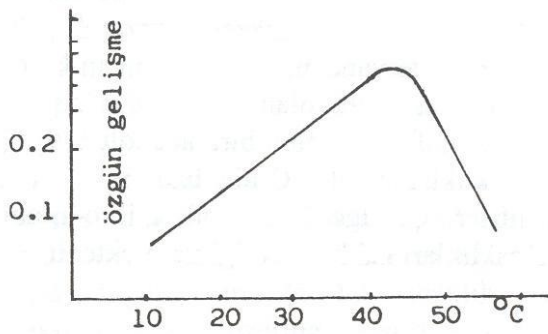
**koşulları** olarak tanımlanır.

### 2.2.1. Sıcaklık

Sıcaklık, mikroorganizmaların gelişmesinde ve faaliyetlerinde gerçekten önemli ve belirleyici olan fiziksel bir etkidir. Sıcaklık, özellikle türlerin seçiminde önemli rol oynar. Değişik ortamlarda, farklı türler üzerine sıcaklığın etkisi de farklı olmaktadır. Bazı mikroorganizma türleri çok geniş sınırlar içinde değişen sıcaklıklarda gelişme gösterirler. Buna karşın, diğerleri ancak dar bir alanda aynı yeteneğe sahiptirler. Örneğin, toprak ve bitkisel materyallerden üretilen mikroorganizmaların büyük bölümü, 30-40°C' lik sıcaklık farkında bile gelişme yeteneğindedirler. Buna karşın, insanlarda hastalık etkeni olan çoğu patojenler, çok daha dar ve en fazla 10°C sıcaklık farklarında gelişme gösterebilirler. Buna neden olarak, mikroorganizmalarda sıcaklığa karşı hücre içi ayarlayıcı bir sistemin bulunmayışı ve hücre içi sıcaklıkla, çevre sıcaklığının aynı oluşu gösterilmektedir. Buna göre, insan vücudunda sürekli sıcaklık 36,5°C olduğundan, insan patojeni mikroorganizmalar bu sıcaklığa göre gelişmelerini yönlendirmişlerdir ve bu sıcaklığın birkaç derece altında veya üstünde gelişme yeteneklerini yitirirler. Bu ise insanlık için sevindirici bir özelliktir. Çünkü bulaşıcı hastalıklarda vücut sıcaklığının bir iki derece yükselmesiyle, hastalık etkenlerinin gelişmeleri artan vücut sıcaklığı tarafından önlenebilmektedir. Tersine, toprak ve bitki materyallerinde hakim sıcaklık mevsimlere, hatta günün değişik saatlerine göre çok değişken olduğundan; buralarda yaşayan mikroorganizmalar da bu duruma uymuşlardır. Böylece, çok geniş sınırlar arasında değişen sıcaklıklarda gelişme yeteneklerini yitirmezler. Bu da yine insanlık için olumlu bir durum olabilir. Örneğin, teknikte kullanılan maya, bakteri veya küf mantarları çoğunlukla en iyi gelişmelerini 30°C civarında gösterirler. Fakat, kullanım amacına göre bunlardan 7-40°C 'arasındaki sıcaklıklarda yararlanılabilir. Örneğin, bira üretimi gibi çok düşük sıcaklık isteyen durumlarda, bira mayaları 7°C'de, hatta daha düşük sıcaklıklarda kullanılırken; ispirto mayaları ile 35-40°C'ler de çalışılır. Fakat, mikroorganizmaların bu denli geniş sıcaklıklar arasında çoğalma yeteneğinde oluşları, bitki hastalıkları veya besin maddelerinin bozulması yönlerinden insanlığın zararına bir durumdur. Mikroorganizmaların sıcaklığa karşı gösterdikleri bu farklı uyum, onların kendi aralarında farklı gruplara ayrılmasına neden olmaktadır. Örneğin, 10°C veya daha dar alandaki sıcaklık değişimine uyma yeteneğindeki mikroorganizmalar **stenotermal**, 30-40°C gibi oldukça geniş sınırlar arasındaki sıcaklık değişiminde gelişme yeteneğini sürdüren mikroorganizmalar **öyritermal** mikroorganizmalar olarak isimlendirilmişlerdir.

Mikroorganizmalar yalnızca sıcaklık değişimine gösterdikleri uyum yetenekleri ile

değil, aynı zamanda en iyi gelişme gösterdikleri sıcaklık derecelerine göre de farklı özellik gösterirler. Mikroorganizmalar için en az (minimum), en yüksek (maksimum) ve en uygun (optimum) gelişme sıcaklıklarından söz edilir. En yüksek ve en az gelişme sıcaklıkları, gelişmenin güçleştiği ve durma aşamasına yaklaştığı sıcaklıklardır. Eğer bu sıcaklıkların biraz üstüne veya altına geçilecek olursa gelişme tümden durur. En uygun gelişme sıcaklığı ise mikroorganizmanın en kısa sürede, en fazla gelişmeyi gösterdiği veya en fazla ürün oluşturduğu sıcaklık dereceleridir. Bu sıcaklık derecesi çok sayıda mikroorganizma için en yüksek gelişme sıcaklığına, en az gelişme sıcaklığından daha yakındır. Ancak, mikroorganizma gelişmesi bir grafikte gösterilecek olursa, en uygun gelişme sıcaklığından, en yüksek gelişme sıcaklığına doğru daha dik; en az gelişme sıcaklığına doğru daha yatık bir eğri elde edilir (Şekil 2.1). Yani, azalan sıcaklığın etkisi, yükselen sıcaklığın etkisi kadar ani ve fazla değildir. Mikroorganizmalar, en uygun gelişme sıcaklıkları esas alınarak üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; **termofil**, **mezofil** ve **psikrofil (kriyofil)** olarak tanımlanan gruplardır. Eğer mikroorganizmanın en iyi gelişme sıcaklığı  $45^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerinde ise **termofil**, yani sıcaklığı seven grubu oluşturur. En uygun gelişme sıcaklığı  $20-40^{\circ}\text{C}$ 'ler arasında olan mikroorganizmalar **mezofil** grubu meydana getirirler. Ancak, bazı araştırmacılar, bu grup için en iyi gelişme sıcaklığını  $20-37^{\circ}\text{C}$  arasında olacak şekilde de belirtmektedirler.



Şekil 2.1. Sıcaklığın mikroorganizma gelişmesi üzerine etkisi

### 2.2.2. pH

Mikroorganizmaların gelişme ve faaliyetlerini etkileyen ikinci önemli koşul, geliştikleri ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonu, yani ortamın asitlik veya alkalilik durumudur. Kimyadan da hatırlanacağı gibi hidrojen iyonları konsantrasyonu, yazım ve ifade kolaylığı olması bakımından, bu konsantrasyonun eksi logaritması olan pH ile ifade edilmektedir. Bu nedenle mikroorganizmaların gelişmesini etkileyen faktörlerden söz ederken, asitlik veya alkalilik yerine pH'nın etkisi ifade edilmektedir. Mikroorganizma

gelişmesine pH'nın etkisinde de, sıcaklığın etkisinde olduğu gibi, en düşük, en uygun ve en yüksek gelişme pH'larından söz edilir. Sıcaklığın etkisinde de açıklandığı gibi, en düşük veya en yüksek gelişme pH'sı dendiğinde, mikroorganizma gelişmesinin güçleştiği pH değeri anlaşılır. Bu sınırın hemen biraz altında veya üstünde gelişme durur. En uygun gelişme pH'sı ise, birim zamanda en fazla gelişmenin görüldüğü veya en fazla metabolizma ürününün oluştuğu pH değerini belirtir. En düşük ve en yüksek gelişme pH' ları arasında yalnızca 3-4 birimlik bir fark bulunur. Fakat, bu bazı mikroorganizma türlerinde daha fazla da olabilir. Ancak, bunlar azınlıkta kalmaktadır. Örneğin, bir *Penicillium* türü en düşük 1.6, en yüksek 11.1 pH'larda gelişebilir ve arada 9.5 birimlik bir fark bulunmaktadır. Buna karşın, en düşük ve en yüksek gelişme pH' ları farkının dar olduğu mikroorganizmalar da vardır. Örneğin, kükürt bakterilerinden *Thiobacillus thiooxidans* türünde bu fark yalnızca 0.5 birimdir. Ayrıca, sayısal olarak ifade edilen 3-4 pH birimlik bir fark az sayılmamalıdır. Çünkü, dört birimlik bir pH değişimi, hidrojen iyonu konsantrasyonunda 10.000 kezlik bir artış veya azalışı ifade etmektedir. Yani özet olarak, pH değişimi dar sınırlarda da olsa, bunun karşılığı olan hidrojen iyonları konsantrasyonundaki değişiklik oldukça yüksek değerlerde olmaktadır. Mikroorganizmaları, pH isteklerine bakarak, sıcaklık istekleri yönünden yapıldığı gibi, belirli değerlere bağlı gruplara ayırma olanağı yoktur. Fakat, yine de bu yönde bazı tanımlamalara gitmek ve en azından değişik sınıf veya cinsten mikroorganizmalar için ayırım yapmak mümkündür. Örneğin, mikroorganizmaların değişik pH derecelerinde gelişme durumu dikkate alınarak 4 gruba ayrılması önerilmektedir. Bu gruplar aşağıdaki şekilde verilebilir.

a- Prokaryotların büyük bir bölümünü teşkil eden bakterilerin çoğu, nötr pH'ya yakın değerlerde en düşük ve en yüksek gelişme pH'larına sahiptir ve bunların gelişmeleri 5-9 pH'lar arasında olmaktadır. Fakat, bakteriler arasında düşük pH'ya, yani aside karşı dayanma yeteneğinde olanlar da vardır. Bunların düşük pH değerlerine karşı durumları farklı olduğundan, kendi aralarında **asit toleranslı ve asidofil** olarak ayrılırlar. Laktik asit bakterileri ile bazı asetik asit (sirke) bakterileri asit tolerans, sirke üretiminde kullanılan asetik asit bakterileri (*Acetobacter acidophilus*) ile, 2-3.5 pH' larda gelişme gösteren *Thiobacillus thiooxidans* asidofil (asidi seven) bakterilere örnek gösterilebilir.

b- Mantarlardan büyük bir bölümü ve özellikle çok sayıda küf mantarları, 1 pH'ya kadar olan yüksek asitli ortamlarda gelişebilirler ve mantarlar için ortalama en uygun gelişme pH'sı 5 dolayındadır. Bu nedenle, birçok organik asit üretiminde küf mantarlarından yararlanılır. Ayrıca, asitli besinlerin depolanmasında yine bunlar sorun yaratır. Fakat, teknik amaçla kullanılmaları durumunda bu denli düşük pH'da, başka mikroorganizmalar kolayca gelişemediğinden özenli ve masraflı bir sterilizasyonu gerektirmezler.

**c- Cyanobacter'ler** çoğunlukla 7 pH gibi oldukça yüksek değerlerde; yani nötr pH' da en uygun gelişmelerini gösterirler.

**d- Protozoa'lar** ise 5-8 pH arasında ve en uygun olarak 7 pH'ya yakın değerlerde gelişme yeteneğindedirler.

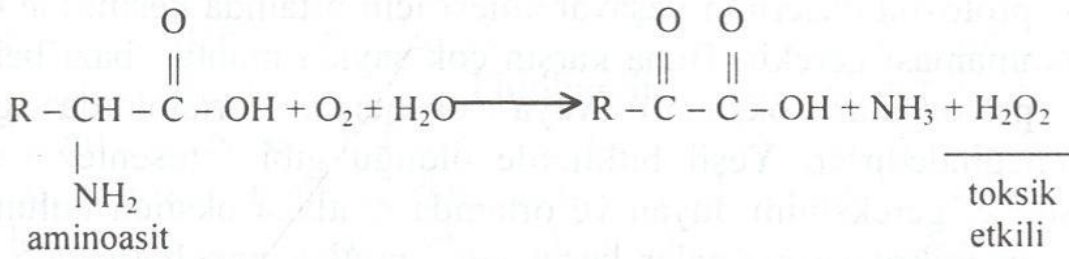
### 2.2.3. Hava (Oksijen)

Bilindiği gibi gelişmiş canlıların yaşamında hava yani oksijen, yeri başka şekilde doldurulamayan bir madde olup, mutlak yeterli düzeyde bulunması gerekir. Bir başka ifadeyle oksijen olmaksızın ne hayvan ve insan, ne de bitkiler yaşayamaz. Ancak, bitkiler oksijeni fotosentez sırasında oluşturma yeteneğindedirler. Gelişmiş canlıların solunumu için bu denli büyük önem taşıyan oksijen, mikroorganizmalar için iki yönlü öneme sahiptir. Bazı mikroorganizmaların yaşamında oksijen, mutlak gerekli olurken; diğer bazı mikroorganizmalarda mutlak zararlı bir etken olabilmektedir. Örneğin, çok sayıda bakteri ve bazı protozoa türlerinin yaşayabilmesi için ortamda kesinlikle oksijen bulunmaması gerekir. Buna karşın çok sayıda mantar, bazı bakteriler ve protozoalar oksijenli veya oksijensiz ortamlarda gelişme yeteneğindedirler. Yeşil bitkilerde olduğu gibi fotosentez sırasında oksijene gereksinim duyan ve ortamda mutlaka oksijen bulunmasını isteyen mikroorganizmalar kesin veya mutlak **aerob** (havayı seven) mikroorganizmalar olarak tanımlanır. Ortamda az da olsa oksijen varlığında gelişme yeteneğinde olmayan mikroorganizmalar ise kesin veya **mutlak anaerob** (havasız yaşayan) mikroorganizmalardır. Bir başka grup mikroorganizma için oksijen bu denli önemli olmayabilir. Yani bunlar hem oksijenli, hem de oksijensiz ortamlarda gelişebilirler. Bu tür mikroorganizmalar **fakültatif anaerob** olarak isimlendirilirler. Tüm bunlardan başka, diğer bazı mikroorganizmalar, yani belirtilen bu üç gruba da uymayan mikroorganizmalar da bulunmaktadır. Bunlar ancak düşük oksijen konsantrasyonlarında gelişme yeteneğindedirler. Ne atmosferik havanın içerdiği oksijen konsantrasyonunda, ne de tümüyle havasız ortamda gelişemezler. Daha çok kirlenmiş ve böylece oksijen konsantrasyonu oldukça düşmüş olan kirli sularda yaşayan bakterilerin oluşturduğu bu grup **mikroaerofilik** (az hava seven) mikroorganizmalar olarak ayrılır. Örneğin, kirli sularda rastlanan *Sphaerotilus natans* bu tür bir mikroorganizmadır. Ayrıca, insan ve hayvanlarda patojen etkiye sahip bazı bakteriler de mikroaerofiliktirler.

Gelişmeleri için mutlaka oksijene ihtiyaç duyan mikroorganizmalar oksijeni iki şekilde kullanırlar. Oksijenin asıl ve en önemli kullanılma şekli, elektron taşıma sisteminin son elektron alıcısı olarak, gerekli enerjinin sağlanmasında olmaktadır. Buna karşın ikinci kullanılma şekli olan enzimatik tepkimelerde harcanan oksijen miktarı çok azdır. Örneğin,

hidrokarbonların oksidasyonunda moleküler oksijen bir hidrokarbon molekülüne ilave olur. Benzer şekilde sterollerin ve doymamış yağ asitlerinin sentezinde de moleküler oksijene gerek vardır.

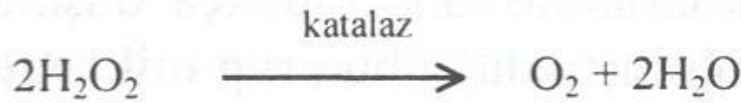
Mutlak anaerob mikroorganizmalar için oksijen toksik etkilidir. Bu etki doğrudan oksijenden değil, oksijen kullanılan enzimatik tepkimelerden açığa çıkan, zehir etkili metabolik ürünlerden kaynaklanır. Örneğin, **aminoasit oksidaz** gibi flavoproteinler zehir etkili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluştururlar. Oksijenin asıl serbest formu süperoksit iyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve süperoksitten oluşan ürünler 1/2O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve serbest OH<sup>-</sup> aşırı aktif



ve toksik etkilidirler. Havalı ortamda gelişen veya havaya karşı direnci olan mikroorganizmalar iki ayrı enzim oluşturarak, bu aşırı toksik etkili süperoksit ürünlerini zararsız hale getirirler. Bu enzimlerden ilki **süperoksit dismutaz** enzimidir. Bu enzim süperoksiti hidrojenperoksit'e dönüştürerek aşırı toksitenin oluşumunu önler.



İkinci enzim olan **katalaz** ise, oluşan hidrojenperoksiti oksijen ve suya parçalayarak toksiditeyi tümünden yok eder.



Mutlak anaerob mikroorganizmalar bu mekanizmayı tümüyle gerçekleştirme yeteneğinde olmadıkları için hava varlığında gelişmelerini sürdürmezler. Belirtilen enzimlerden eksik olan daha çok katalaz enzimidir. Laktik asit bakterileri gibi bazı mikroorganizmalar, hidrojenperoksiti parçalayacak katalaz enziminden yoksundurlar. Fakat, bunlar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i başka yoldan parçalarlar ve hava varlığında aşırı bir etkilenme göstermezler.

#### 2.2.4. Ozmotik Basınç

Mikroorganizmaların gelişmelerinde önemli çevre koşullarından biri de

mikroorganizmanın bulunduğu ortamın ozmotik basıncıdır. Yani mikroorganizmanın geliştiği ortamın tuz, şeker ve benzeri maddelerin konsantrasyonu gelişme için büyük önem taşır. Çoğu mikroorganizmalar % 10'a kadar olan tuz konsantrasyonlarında gelişir ve % 10'un üzerindeki tuz konsantrasyonları gelişmeyi durdurucu etkiye sahiptir. Bundan yararlanılarak bazı besinler salamura içinde bozulmadan korumaya alınır. Fakat, aşırı tuza dayanıklı mikroorganizmaların çok yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebileceği unutulmamalıdır. Kısaca fazla tuzda gelişebilen **halofil** (tuz seven) mikroorganizmalar da vardır. Şeker de buna benzer etkiye sahiptir. Besiyerlerinde çözülmüş olarak bulunan şeker, hücreler üzerine belirli bir ozmotik basınç yapar ve tuzda olduğu gibi artan şeker konsantrasyonu, mikroorganizma gelişmesini olumsuz yönde etkiler. Mikroorganizma hücre içeriği, yaklaşık % 10-20'lik sakkaroz çözeltisinin ozmotik basıncına eşdeğerde ozmotik basınca sahip olduğuna göre, çevrede bulunan şeker konsantrasyonu bu miktarı ne kadar geçerse, mikroorganizma üzerine olumsuz etkisi de o kadar artar. Bununla birlikte, şeker konsantrasyonu için tüm mikroorganizmalara geçerli olacak bir üst sınır vermek olanaksızdır. Çünkü, bazı mantarlar % 60-70 şeker konsantrasyonunda bile az da olsa gelişebilirler. Yine de şekerlerin bu etkisinden yararlanılarak bazı besinleri, reçel vs. şeklinde dayanıklı duruma getirmek mümkündür.

Tuz ve şekerlerin yüksek konsantrasyonda olmaları ile beliren bu olumsuz etki, çok düşük konsantrasyonlarda veya hiç bulunmamaları halinde de söz konusudur. Eğer sıvı ortamda hiç bir madde çözünmemişse, yani damıtık su veya benzeri durum varsa, mikroorganizma böyle bir sıvıda da olumsuz etkilenir ve hücre içi basınç nedeniyle su alarak madde kaybına uğrar. Bu durumu önlemek için mikrobiyolojik çalışmalarda en azından fizyolojik su kullanılmaktadır. Fizyolojik su bir litresinde 8.5 g NaCl çözülmüş olan damıtık sudur.

### 2.2.5. Işık

Genelde ışık, mikroorganizmaların gelişmelerinde diğer canlılar kadar önemli bir etken değildir. Yani, çok sayıda mikroorganizma ışık olmadan yaşayabilir; hatta birçoğunda doğrudan güneş ışığı zararlıdır. Fakat alg'lerde olduğu gibi, fotosentetik renk maddesi bulunan ve fotosentez yapan mikroorganizmalarda ışığa mutlak gereksinim vardır. Bunların dışında çok az sayıda mantar türleri, gelişmelerinin kısa bir döneminde aydınlığa gereksinim duyabilmektedir. Diğer tüm mantarlar ve bakteriler, herhangi bir şekilde ışık isteği göstermezler ve tüm mikrobiyolojik çalışmalar bilinçli olarak ışıksız ortamda gerçekleştirilir. Daha doğrusu, mikroorganizmaların kültüre alınarak çoğaltılmaları veya bunlar yardımıyla belirli maddelerin üretimi kapalı kaplarda, yani ışıksız ortamlarda yapılır. Doğrudan güneş

ışığı, kısa dalga boyundaki ışınlar nedeniyle çoğu mikroorganizmalara zararlıdır.

### **2.2.6. Diğer Gelişme Etkenleri**

Mikroorganizmaların gelişme ve faaliyetleri, yukarıda ayrıntıları ile incelenen etkenlerden başka, diğer bazı koşulların da etkisindedir. Kısaca belirtilmesi gereken bu koşullar, karıştırma, gelişme faktörleri ve gerekli elementler olarak sıralanabilir. Aslında bunlar daha önce belirtilen gelişme koşullarından daha az önemli değildir. Fakat, son ikisi, daha önce besin elementleri ve beslenme bölümünde belirtildiği için burada kısaca özetlenecektir.

İlk olarak karıştırmanın etkisini belirtecek olursak, karıştırma ilk anda havalandırma ile birlikte akla gelir. Buna neden, havaya açık sıvıların karıştırılması sırasında, sıvının çözünmüş oksijen konsantrasyonunun artmasıdır. Aslında, mikrobiyolojik üretimlerde karıştırma, havalandırma ile ilgili görülmemelidir. Hatta, anaerob mikroorganizmalarla çalışılması veya üretimi amaçlanan mikrobiyel ürünün eldesinde, havalandırmanın sakıncalı olması nedeniyle, karıştırma işleminin ortama oksijen karışmayacak kap veya koşullarda yapılmasına ayrı bir özen gösterilir. Çalışılan mikroorganizmanın diğer gelişme koşullarına karşı özelliği ne olursa olsun, karıştırmanın gelişmeye olumlu etkisi aşağıdaki nedenlere dayanır.

a- Karıştırma veya çalkalama olmaksızın üretilen mikroorganizma kültüründe, metabolik ürün olarak gaz çıkışı olsa bile, bir miktar hücre zamanla kültür kabının dibine çökerek, sıvı içinde erimiş durumda bulunan besin maddeleri ile teması azalır. Buna karşın karıştırma ve çalkalama hücrelerin çökmesini önleyeceğinden tüm hücreler sıvı içinde dağılmış olarak kalacak ve böylece daha fazla mikroorganizma hücresi, daha geniş bir yüzey alanında besin maddeleri ile temasa geleceğinden, daha etkin gelişme ve faaliyet sağlanmış olacaktır.

b- Belirli bir sıcaklıkta çalışılması zorunluluğu olan durumlarda karıştırma olmazsa, dış hava sıcaklığına bağlı olarak kültür kabının farklı katmanlarında değişik sıcaklıklar olacak, yani dış kısım daha çabuk soğuyacak veya ısınacak, iç kısımlara göre daha farklı sıcaklıkta olacaktır. Bu durumda, belirli bir sıcaklıkta en iyi gelişmeyi gösteren mikroorganizmanın, bir kap içindeki sıvı ortamın değişik kısımlarında farklı bir gelişme göstermesi durumu ortaya çıkacaktır. Bunun önlenmesi ve tüm kap içeriğinde tekdüze bir gelişme sıcaklığı ile en iyi gelişmenin sağlanması için karıştırma yine olumlu etkilidir.

c- Karıştırma uygulamaksızın yapılan bir mikrobiyolojik üretimde, metabolizma ürünleri mikroorganizmanın öncelikle fazla çoğaldığı belirli kısımlarda yoğunlaşarak,



mikroorganizmanın gelişmesine durdurucu etki yapabilmektedir. Ayrıca, organik asit üretiminde olduğu gibi ortam içine nötralize edici veya tamponlayıcı maddeler ilave ediliyorsa, karıştırma ile tüm ortamda bu maddelerin etkin bir şekilde dağılması ve görevini yapması sağlanarak, yine olumlu yönde etki gerçekleştirilir.

Gelişme faktörlerinin mikroorganizma gelişmesine etkileri de aşırı bir önem taşır. Gelişme faktörleri olarak tanımlanan maddeler daha önce de belirtildiği gibi çok az miktarları ile gelişmeyi olumlu yönde etkileyen organik bileşiklerdir. Bu nedenle **organik gelişme faktörleri** olarak da tanımlanır. Bunlar, vitaminler, amino asitler, purin ve pirimidin' lerdir. Eğer bir mikroorganizma bu maddelerden birine gereksinim duyarsa, gereksinim duyulan maddenin ortamda eksik olması durumunda, tüm diğer koşullar bulunsa bile istenen gelişme sağlanamaz. Ancak, bu maddenin çok az dozda da olsa ortama ilavesi gelişmeyi teşvik eder. Hatta mikroorganizmalar bu tür maddelere karşı gösterdikleri istekler dikkate alınarak çeşitli beslenme tiplerine ayrılırlar.

Mikroorganizmaların gelişmesini önemli ölçüde etkileyen bir başka etken de, hücre maddelerinin oluşumunda gerekli elementlerdir. Besiyerlerinin bileşiminden hatırlanacağı gibi eğer kullanılan ortam mineral maddeler bakımından (makro, mikro ve iz elementler) yeterli değilse, istenen gelişme sağlanamaz. Bu nedenle tam ve kusursuz bir gelişme sağlamak için mikroorganizmanın gelişmesinde gerekli tüm elementler ortamda bulundurulmalıdır.

Son iki etken değişik mikroorganizmaların istekleri dikkate alınarak ayarlandığında, karışık bir populasyonda belirli türlerin gelişmeleri önlenir veya teşvik edilebilir ve böylece sınırlı da olsa bir seçime gidilebilir.

### 3. MİKROORGANİZMA GELİŞMESİNİN ÖNLENMESİ

Her zaman ve her işlemde mikroorganizmanın gelişmesi istenmez. Mikrobiyolojik çalışmaların bir bölümünde, mikroorganizmaların saf olarak yetiştirilmeleri ve bunlardan değişik şekillerde yararlanılması amaçlanmışken; diğer bölümünde bu canlıların faaliyetlerinin durdurulması ve zararlı etkilerinden korunulması amaçlanmıştır. Mikrobiyolojik çalışmalar dışında kalan birçok faaliyet alanlarında ise asıl amaç, ortamda bulunabilecek mikroorganizmaların yok edilmesi ve bozulabilen maddelerin dayanıklı duruma getirilmesi için gerekli teknik işlemlerin uygulanmasıdır. Doğrudan mikroorganizmanın materyal olarak seçildiği durumlarda bile, kullanılacak besiyeri, kapkacak ve çalışmada gerekli tüm vasıtalar, öncelikle doğal floradan arındırılmalıdır. Bu

sağlanmayacak olursa, doğal bir kaynaktan saf mikroorganizma kültürü elde edilmemesi yanında; saf kültürle aşılama yapılması durumunda, doğal flora ile bulaşma sonucu, sağlıklı ve güvenli bir sonuç alınamaz ve amaca ulaşılamaz. Ayrıca, değişik canlılarda hastalıklara neden olan mikroorganizmaların, hastalık öncesi veya hastalık sırasındaki uygulamalarla gelişmelerinin önlenmesi sağlık yönünden önem taşır. Mikroorganizmaların gelişmesini önlemede, ya bunların ortamdaki yok edilmeleri, veya gelişmelerinin durdurularak zararsız hale getirilmeleri şeklinde iki ana ilke uygulanır. Mikroorganizmaların tümüden öldürülerek yok edilmeleri, daha çok cansız materyallerde uygun bir tekniktir. Gelişmelerinin durdurulması ise canlılar üzerindeki bulaşmalarda uygulanır ve bu amaçla değişik organik ve anorganik maddelerden ve her iki durumda da değişik yöntemlerden yararlanılır.

### **3.1. Mikroorganizmaların Öldürülmeleri veya Ortamdan Uzaklaştırılmaları**

Ölüm ve öldürme canlılar için kullanılan tanımlamalardır. Tek hücreli de olsa mikroorganizmalar için de geçerli olan bu tanımlamaların öncelikle anlamını belirtmek gerekir. Mikroorganizmalar söz konusu olduğuna göre, bir hücrenin ölmesi demek, yaşama yeteneğini bir daha geri kazanmayacak şekilde yitirmesi demektir. Öldürme ise bir hücreye yaşama yeteneğini kaybettirmek anlamına gelir. Bir hücre öldürüldükten sonra, koşullar onun yaşaması için en uygun duruma getirilse bile, bu hücrenin yeniden çoğalması ve faaliyet göstermesi olanaksızdır. Mikroorganizmaların öldürülmesinde teknik olarak **sterilizasyon** ve **dezenfeksiyon** tanımlamaları kullanılır. Sterilizasyon denince, ortamda bulunan tüm mikroorganizmaların öldürülmesi ve ortamın canlı mikroorganizmalardan tümüden arındırılması anlaşılır. Dezenfeksiyonda ise yalnızca ortamda bulaşma etkeni olan bir mikroorganizmanın veya patojenlerin öldürülmesi amaçlanır ve anlaşılır; zararsız olanlar canlı kalabilir. Fakat, teknik gelişmeler son yıllarda bu alanda kullanılan tanımlamalarda bir takım değişikliklere ve karışıklıklara neden olmuştur. Örneğin, teknik bakımdan en küçük bakteri hücresinin veya sporunun bile geçemeyeceği çok ince gözenekli filtrelerin yapılması, soğuk sterilizasyon tekniğinin gelişmesini sağlamıştır. Burada hücrelerin öldürülmesi söz konusu değildir. Fakat, bu filtrelerden süzülen sıvılar mikroorganizmalardan tümüyle arındırıldığı için, uygulanan işlem yine de sterilizasyon olarak tanımlanır. Benzer şekilde dezenfeksiyon da klasik tanımının dışına taşmış ve yeni geliştirilen dezenfektan maddeler yardımıyla çok geniş etki sağlanarak, ortamda bulunan tüm mikroorganizmaların öldürülmesi olanaklaştırılabilmektedir. Ayrıca, günümüzde dezenfeksiyon tanımı, tüm patojenlerin öldürülmesi için ve daha çok hijyen biliminde kullanılan bir tanımlama olmuştur.

### 3.1.1. Sterilizasyon

Günümüzde sterilizasyon dendiğinde, genel olarak bir ortam veya maddenin mikroorganizmalardan veya bunların dinlenme şekillerini teşkil eden formlarından arındırılması anlaşılır. Bir ortam veya maddenin sterilizasyonu sıcaklık uygulaması, filtrasyon, ışınlama ve kimyasal madde kullanımıyla sağlanabilir. Bunlar aşağıda ayrı ayrı incelenecektir.

#### 3.1.1.1. Mikroorganizmaların sıcaklıkla öldürülmesi

Mikroorganizmaların sıcaklığa dayanıklılıkları oldukça farklıdır. Bu, tür özelliği olduğu gibi, sıcaklığın kuru veya nemli olmasına ve mikroorganizmanın içinde bulunduğu yaşam evresine bağlıdır. Örneğin, mikroorganizmalar kuru sıcaklığa, nemli sıcaklıktan daha fazla dayanma gücüne sahiptirler. Çünkü, sıcaklıkla öldürme, hücre proteininin koagülasyonuna dayanır ve yeterli nem bu olayı çabuklaştırır. Aynı şekilde vejetatif hücreler, spora oranla daha düşük sıcaklıklarda canlılıklarını yitirirler. Bu nedenle kuru sıcaklık uygulamasında veya sporlar söz konusu olduğunda daha yüksek sıcaklıklar gerekli olmaktadır ve uygulamada da bu şekilde hareket edilmektedir.

Mikroorganizmaların öldürülmesinde kuru sıcaklık uygulaması, sıcaklığa dayanıklı alet, malzeme ve aksamın mikroorganizmalardan arındırılmasında kullanılır. Örneğin, mikrobiyolojik çalışmalarda çok kullanılan aşı iğnesi veya aşı gözü (öze) açık alevde akkor haline getirilerek mikroorganizmalar öldürülür. Bazı cam malzemeler (pipet, petri, erlen vs.) uygun hazırlıktan sonra 160-200°C' deki dolaplarda, 1-2 saat tutularak steril hale getirilebilir. Fakat kuru sıcaklık, laklı veya kalaylı metal alet ve ekipmanlarla, yüksek ve kuru sıcaklıkla şekil veya bileşimi değişen malzemelerden yapılmış alet vb. için uygun değildir. Ayrıca, su içeren maddeler de kuru sıcaklıkla steril hale getirilemez. Kuru sıcaklıkla mikroorganizmaların öldürülmesinde, sıcaklık derece ve süresinin saptanması, sıcaklığa en dayanıklı mikroorganizma sporu dikkate alınarak yapılır. Bazı toprak bakterilerinin sporları 150°C sıcaklıkta ancak 3 saatte, 160°C'de 1.5 saatte ve 170°C'de 1 saatte öldürülebilir. Sıcaklık uygulamasının başarısında mikroorganizma yükünün de önemi büyüktür. Bunu şu eşitlikle açıklamak daha kolaydır.

$N = N_0 \times e^{-kt}$ . Buradan,  $\log N = \log N_0 + \log e \times (-kt)$  elde edilir. Bu eşitlikte  $N_0$  başlangıç mikroorganizma sayısı,  $\log e = 0.43429$ ,  $t$  sıcaklık uygulama süresi ve  $k$  üslü ölme değeridir. Yukarıdaki eşitlikte  $N_0$  'ın büyük olması durumunda, birim zaman sonra canlı kalan hücrenin de fazla olması doğal bir sonuçtur.

Nemli sıcaklık, mikroorganizma üzerine daha fazla etkilidir. Fakat, bu durumda da tür

ve mikroorganizmanın yaşam evresi büyük önem taşır. Örneğin, bir çok bakteri ve küf mantarının vejetatif hücreleri 60°C sıcaklıkta 5-10 dakikada canlılığını kaybeder. Maya hücreleri ise ancak 80°C'nin üzerinde 15 dakikada öldürülebilmektedir. Bu mikroorganizmaların sporları ise sıcaklığa daha da dayanıklıdır. Mantar sporları 80°C'nin, bakteri sporları ise 120°C'nin üzerinde 15 dakikada öldürülebilirken, bazı termofil bakteri sporlarında bu süre çok daha uzundur (Çizelge 3.1). Görüldüğü gibi nemli sıcaklığın etkisi artan sıcaklık derecesi ile artmaktadır. Bu nedenle işlemi kolaylaştırmak, süreyi kısaltmak ve işi güvenceye almak için normal kaynama sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklar kullanılır. Yani basınç altında buhar sıcaklığından yararlanılır. Bu amaçla **otoklav olarak** tanımlanan aletler kullanılır. Düşük sıcaklıkta, yani kaynama sıcaklığında

Çizelge 3.1. Nemli sıcaklığın bakteri sporları üzerine etkisi

Spor türü	Sporun ölme süresi (dakika)				
	100°C	105°C	110°C	120°C	125°C
<i>B. anthracis</i>	2-15	5-10			
<i>B. subtilis</i>	saatlerce				
<i>C. tetani</i>	50-90	5-25			
<i>C. botulinum</i>	300-530	40-120	32-90	4-20	
Toprak bakterileri	saatlerce	420	120	6-30	4
Termofil bakteriler	.....	400	100-300	11-35	3.9-8

çalışılması durumunda sıcaklıkla sterilize edilecek alet-ekipman, soda, deterjan veya benzeri maddeler ilave edilerek, sıcaklığın etkisi artırılmış su içinde kaynatılarak mikroorganizmalardan arındırılır. Bu durumda 15-20 dakikalık kaynatma yeterli olabilir. Yüksek sıcaklıktan zarar görmeyen besiyeri veya kuru sıcaklıkla sterilize edilemeyen, fakat nemli, yüksek sıcaklıktan etkilenmeyen alet-ekipman otoklavda belirli sıcaklıkta, belirli süre tutularak mikroorganizmalar öldürülür. Otoklavlarda sıcaklık yerine, bunun karşılığı olan basınç **atü** olarak belirtilir. Bu nedenle otoklav kullanılmasında her sıcaklığa karşılık olan basıncın bilinmesi gerekir. Çizelge 3.2 bu konuda bilgi vermektedir. Ancak, belirtilen basınçlarda, bunlara karşılık olan sıcaklık derecelerine ulaşabilmek için otoklav içindeki havanın iyice boşaltılması gerekir. Çünkü, havanın boşaltılmaması durumunda sıkışan hava, sıcaklık yeterince yükselmese de basıncı yükseltir. Havanın boşaltılması ya başlangıçta buhar çıkış musluğu açık bırakılarak, ilk anda oluşan buhar vasıtasıyla dışarı atma şeklinde veya içteki havanın vakumla emilmesi şeklinde yapılır.

Çizelge 3.2. Buhar basıncı ile sıcaklığı arasındaki ilişki

Buhar		Buhar	
basıncı atü	sıcaklığı °C	basıncı atü	sıcaklığı °C
0.2	105.0	1.5	126.7
0.5	110.8	2.0	132.0
0.69	115.0	2.5	138.1
1.0	119.6	3.0	142.8

Uygulamada daha çok ilk yöntem geçerlidir. Özellikle besiyerlerinin otoklavda sterilizasyon süresi yalnız sıcaklıkla veya bulunması olası mikroorganizma türüne göre değil, sıcaklık uygulanan kabın büyüklüğüne, yani kapasitesine göre de değişir. Çizelge 3.3, 121-123°C'de otoklavlanan sıvıların sterilizasyon süresini kap büyüklüğüne göre vermektedir. Yeterli bir sterilizasyon ve güvenli bir çalışma için bu süreler mutlaka uygulanmalıdır.

Nemli de olsa yüksek sıcaklık uygulaması, ancak sıcaklığa dayanıklı malzemelerde yapılabilir. Jelatinle katılaştırılmış besiyeri veya fermentasyon ve özümleme deneyi için şeker ilave edilen besiyerleri yüksek sıcaklıktan olumsuz etkilenirler. Örneğin, jelatin suyun kaynama sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda tutulacak olursa, soğuyunca yeniden sertleşme özelliğini yitirir. Şekerler ise en azından karamelize olur. Bu tür maddelere nemli sıcaklık uygulaması **kademeli sterilizasyon** yöntemiyle gerçekleştirilir. Buharlayıcı olarak tanımlanan aletler içine konan malzeme, yaklaşık 100°C'deki (suyun kaynama sıcaklığında) buharda

Çizelge 3.3. 121-123°C'deki otoklavda sıvı besiyerlerinin kap büyüklüğüne bağlı olarak sterilizasyon süreleri.

Kap cinsi	Kap hacmi ml	Sterilizasyon süresi dakika
Cam tüp	( 18x 150 mm)	12-14
Erlen	50	12-14
Erlen	200	12-15
Erlen	1000	20-25
Erlen	2000	30-35
Damacana	9000	50-55

yarım saat tutulur. Bu süre sonunda vejetatif hücreler öldürülmüş olur. Ancak, bakteri sporları öldürülemez. Canlı kalan bu sporların çimlenmesi ve vejetatif hücre şekline dönüşmesi için 24 saat inkübasyon sıcaklığında bekletilir. Bu süre sonunda yeniden 30 dakika buhar sıcaklığında tutulur ve bu işlem toplam olarak üç gün arka arkaya yinelenir. Sonuçta sporlar da çimlendirilerek buhar sıcaklığında öldürülmüş ve ortam mikroorganizmalardan tümünden arındırılmış olur. Bu olay mikrobiyolojide **tindalizasyon** olarak tanımlanır.

Bazı durumlarda örneğin, mutlak steril bir ortam gerektirmeyen mikrobiyolojik çalışmalarda veya sınırlı süre içinde korunması gereken, fakat yüksek sıcaklıkta bileşiminde istenmeyen bir takım değişimler olabilen maddelerde kısmi bir arındırma işlemi yeterli olur. Bu durumlarda 75-85°C sıcaklıkta veya daha aşağıda 5-10 dakika süreyle sıcaklık uygulanarak vejetatif hücreler öldürülür. Bu işlem **pastörizasyon** olarak tanımlanır. Bu şekilde hazırlanan ortamlar, saf mikroorganizma kültürü ile aşılandığında, etkin durumdaki aşılama materyali kısa sürede gelişerek ortama hakim olur ve sıcaklıktan zarar görmemiş olan sporların gelişmesini engeller. Diğer bir uygulama sütte yapılır ve pastörize edilen sütler 2-3 gün kadar dayanıklılık kazanmış olur.

Pastörizasyon, asitçe zengin, dolayısıyla pH'sı düşük besin maddelerinin dayanıklı hale getirilmelerinde de uygulanan bir yöntemdir.

### **3.1.1.2. Işınlama ile öldürme**

Bilindiği gibi kısa dalga boyuna sahip ışınlar mikroorganizmalara da öldürücü etkiye sahiptir. Bundan yararlanılarak, özellikle laboratuvarlarda mikroorganizmaların öldürülmesinde kısa dalga boyunda ışınlar kullanılır. Bu ışınlardan **ultraviyole, röntgen ve gamma** ışınları söz konusudur ve en fazla ultraviyole (mor ötesi) ışınları kullanılır. Bu ışın yaklaşık 269 nm dalga boyunda olup, öncelikle hücrenin nükleik asitlerince soğurulur ve yeterli sürede etki ile ölüme neden olur. Bakterilerdeki etkisi daha fazla, mantar sporlarında daha az ve geçtir. Mikroorganizmaların öldürülmesi amacıyla ışınlama laboratuvarlar dışında, steril olması gereken oda veya bölmelerde (ameliyathane vb.) ve besin maddelerinde uygulanır.

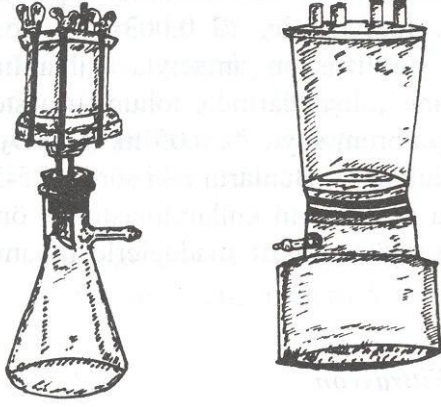
### **3.1.1.3. Kimyasal maddelerle öldürme**

Bazı kimyasal maddeler, çok az konsantrasyonlarda bile mikroorganizmalara öldürücü etki yaparlar. Ayrıca, bu öldürücü konsantrasyonlar, insanlar üzerine olumsuz etkiye sahip değildir veya belirli süre sonra zararsız maddelere dönüşürler. Bunlar besin maddelerinin sterilizasyonunda kullanılır. Kimyasal maddelerin sterilizasyon amacıyla kullanılmaları daha

çok sıcaklığa dayanıksız besinlerde, farmakolojide, bazı alet ve cihazlarda zorunlu olur. Örneğin, laboratuvar çalışmalarında etilenoksit % 5-15 sulu çözelti halinde doğrudan veya % 2-50 konsantrasyon oluşturacak şekilde azot veyahutta  $Ca_2$  ile birlikte gaz halde kullanılır. Sıcaklığa duyarlı madde içeren besiyerlerinde **beta-propiolakton** kullanılır. Ancak, bu madde diğer yan etkileri yanında **kanserogen** etkiye de sahiptir. Fakat, % 0.2 konsantrasyonda kullanılıp, 37°C'de 2 saat tutulduktan sonra bir gece bekletilecek olursa tümünden parçalanır ve olumsuz etkisini kaybeder. İçeceklerde, % 0.003-0.02 konsantrasyonlarında **dietildikarbonat** sterilizasyon amacıyla kullanılır. Steril koşulları gerektiren yetiştirme çalışmalarında, tohumların sterilizasyonunda % 1 'lik **süblimat** veya brom suyu, % 0.05'lik  $AgNO_3$  ve **Ca-hipoklorit** (% 1  $Cl_2$ ) sık sık kullanılır. Bunların etki süreleri 5-30 dakika arasında değişir. Ancak, bu maddelerin kullanılmasından önce tohumların Üst yüzeyi, sabun veya yüzeyaktif maddelerle muamele edilerek iyice ıslatılmalıdır.

### 3.1.2. Filtrasyon

Bazı maddeler bileşim bakımından düşük derecelerde de olsa sıcaklığa duyarlıdır. Isıtılmaya dayanıksız olan bu maddelerin taşıdığı doğal mikroorganizmalar sıcaklık uygulaması ile öldürülecek olursa, ısıtılan madde kullanım amacına yararlı duruma gelir. Fakat, mikroorganizmalarla bırakılacak olursa, ya kısa sürede bozulur veya mikrobiyolojik çalışmalarda doğal florasının gelişmesiyle yanıtıcı sonuçlara yol açar. Bu durumda, mikroorganizma hücrelerinin veya bunların daha küçük boyutlu olan sporlarının geçmesine izin vermeyecek kadar küçük gözenekli filtreler yardımıyla ayrılması yoluna gidilir. Bu amaçla çok ince gözenekli membran filtreler, EK filtre plakaları ve aspest veya kizelgurun preslenmesiyle elde edilen plakalar kullanılır. Tüm bu materyaller çok ince gözeneklidir ve böylece bu filtrelerin gözeneklerinden yalnızca sıvı geçer, fakat ne şekilde ve durumda olursa olsun mikroorganizma geçemez. Bu plakalar önce yüksek ve nemli sıcaklıkta steril hale getirilir ve sterilize edilecek sıvı bundan süzülür. Ancak, sıvı toplama kabının da steril olması zorunludur. Bu yöntemle yalnızca berrak sıvılar sterilize edilebilir. Şekil 3.1, değişik laboratuvar tipi sterilizasyon filtrelerini göstermektedir.



Şekil 3.1. Steriljiltreler (a-EK, b- Membran filtre)

### 3.2.2. Mikroorganizma gelişmesinin durdurulması

Mikroorganizma gelişmesini yavaşlatıcı veya tümünden durdurucu etkiye sahip çok sayıda maddelerin etkileri de çok farklı olmaktadır. Bir kısmı yalnızca ortamda buldukları sürece gelişmeyi engeller ve bunların ortamdaki uzaklaştırılmaları durumunda etkileri de kalkar. Diğer bir kısmı ise, daha önce kimyasal maddelerle öldürmede açıklandığı şekilde öldürücü etkilidir; ortamdaki uzaklaştırılırsa da mikroorganizma yeniden yaşama yeteneğini kazanamaz. Hiç kuşkusuz, kimyasal maddelerin etkileri ortamdaki konsantrasyonlarına da bağlıdır. Doğal olarak konsantrasyon arttıkça, hücre üzerindeki etki de artar. Ayrıca, konsantrasyona bağlı olarak etki şekli de değişebilir. Yani, düşük konsantrasyonlarda yalnızca gelişmeyi durdurucu etki yapan bir madde, konsantrasyonu artırılınca öldürücü etkili olabilir. Kimyasal maddelerin gelişmeyi durdurucu etkisi, yani ortamdaki uzaklaştırılınca etkisinin de ortadan kalkma özelliği **mikrostatik**; öldürücü etkileri ise **mikrobisit** etki olarak ifade edilir. Daha çok mikroorganizmalarla ilgili çalışmalarda bu maddelerden yararlanma sözkonusu olduğunda, mikroorganizma çeşidi dikkate alınarak, çoklukla **bakteriyostatik ve bakterisit** etki tanımlamaları ile karşılaşılır. Genel olarak mikroorganizmaların gelişmesini önleyen kimyasal maddeler **antimikrobiyel** maddeler olarak tanımlanır. Gelişmeyi önleyici kimyasal maddelerin etki mekanizması oldukça değişik şekillerde ortaya çıkmaktadır. Bu etkiler aşağıda ayrı ayrı açıklanmıştır.

#### 3.2.1.1. Hücre yapısı veya hücre zarının bozulması

Hücre yapısının bozulmasına etanolün etkisi somut bir örnek teşkil eder. % 70'lik etilalkol hücre proteininin koagüle olmasına neden olur ve yapısal bozulmayı gerçekleştirerek ölüme yol açar, yani mikrobisit etki ortaya çıkar. Böylece mikrobiyolojik çalışmalarda % 70'lik etilalkol dezenfekte edici olarak kullanılır.

Sabun ve deterjan gibi temizlik maddeleriyle, fenol ve krezol gibi kimyasal maddeler



hücre dışı yüzeyini kavrarlar ve stoplazma zarının yarı geçirgenliğini yok ederler. Bilindiği gibi stoplazma zarı lipid ve proteinlerden oluşur ve lipidler lipofil ve hidrofik uçlara sahiptir. Belirtilen maddeler bu uçlara bağlanarak, bunları görev yapamaz duruma getirir. Mikrobisit etkili bu maddelerden sabun ve deterjanlar, bu özellikleriyle giyeceklerin vs. dezenfeksiyonunda kullanılırlar.

### **3.2.2.1. Enzimlerin bozulması**

Cıva, bakır ve gümüş gibi ağır metaller çok düşük konsantrasyonlarda bile enzim zehiridir. Bunların hem anorganik tuzları, hem de organik bileşikleri enzimlerde etkin rol oynayan -HS grubunu veya Co.A'nın etkin grubunu bağlarlar ve böylece hücrede madde değişimini engellerler. Bazı enzim zehirleri ise hücre enziminin yapısında yer alan metal iyonunu bağlar ve böylece enzimi bloke eder. Örneğin, siyanür (-CN) önemli bir solunum sistemi zehiridir. Bu madde solunum zincirinde görev alan strom-oksidad enziminin demirini bağlar ve solunumu engeller. Karbonmonoksit de aynı enzimi bloke ederek öldürücü etkisini gösterir. Bu tür etki **kompetitif** önleme olarak tanımlanır. Kompetitif önleme, yapı benzerliğine dayanır ve durdurucu madde, enzimdeki benzer yapıya sahip maddenin yerini alarak enzimin etkisini ortadan kaldırır. Bu tür önlemeye başka bir örnek malon asitin süksinik asitten, fumarik asit oluşumunu engellemesidir. Fakat, burada önemli bir fark ortaya çıkar ve bu fark şu şekilde belirtilebilir: Siyanürlerin etkisi oksijen basıncının artırılması ile yok edilemezken, malonasidinin etkisi süksinik asit konsantrasyonunun artırılması ile ortadan kaldırılabilir.

### **3.2.2.3. Hücre yapı maddeleri sentezinin zarar görmesi**

Çok sayıda maddeler hücrenin yapısında bulunan protein ve nükleik asit gibi yapı elemanlarının ve hücre zarının oluşumunu engeller. Buradaki etkiler de aslında bu sentezleri gerçekleştiren enzimlerin veya yapıda yer alan bağların yanlış veya eksik teşekkülü ile olmaktadır. Örneğin, sülfonamid ve p-aminobenzoik asit, yapı olarak birbirine büyük benzerlik gösterirler. Bu iki maddeden p-aminobenzoik asit Co-enzimin yapısında bulunur. Bu nedenle adı geçen asit yerine, sülfonamid hücre tarafından alınarak Co-enzim sentezlenir. Fakat, bu enzim görevini yerine getirmekten yoksundur. Adı geçen enzim görev yapamayınca gelişme de durur. Ancak, p-aminobenzoik asit konsantrasyonu artırılarak sülfonamidin etkisi kaldırılabilir. İnsan ve hayvan organizması, belirtilen Co-enzimi, besinlerle almak zorunda olup, kendileri sentezleme yeteneğinde değildir ve belirli dozlarda sülfonamid bu canlılara zarar vermez. Böylece belirtilen madde tedavi edici olarak, bulaşıcı hastalıklara karşı başarı

ile kullanılır. Yine, benzer şekilde bazı metabolik ve antimetabolik maddeler **antagonistik** etkili olup, yapı maddelerinin oluşumunu önlemektedirler.

Hücre proteinlerinin sentezi çok sayıda antibiyotik tarafından önlenir. Örneğin, kloramfenikol aminoasitlerin protein şeklinde bağlamalarını önler ve böylece kemoterapide değerli bir bakteriyostatik maddedir. Çünkü protein sentezi durunca, hücreler gelişip çoğalamazlar. Ayrıca, etki yalnız protein sentezine özgüdür. Yani seçici olup, diğer maddelerin sentezine etkisi yoktur. Protein sentezinde seçici özellik taşıyan puromisin, polipeptit zincirlerinin polimerizasyonunu engeller. Protein sentezini engelleyen diğer bir antibiyotik olan streptomisin aynı zamanda hücre zarının görevini bozucu etkiye de sahiptir; yani seçici değildir. Bunun protein sentezine etkisi ise, hatalı aminosit düzeni olan polipeptit zincirinin oluşmasıdır.

Mitomisin-C ve aktinomisin-D gibi antibiyotikler ise nükleik asit sentezine engel olarak gelişmeyi önler. Bunlardan mitomisin-C yalnızca DNA sentezini durdurma yeteneğine sahip olup, seçici etkilidir. Yani, RNA ve protein sentezlerine etkili değildir. DNA çift hattının ağ şeklinde bağlanmaları engellenir. Aktinomisin-D ise guanin depolamış olan DNA ile kompleks oluşturur ve böylece her üç tipte RNA'nın, yani m-RNA, r-RNA ve t-RNA sentezini önler.

Penisilin ve türevleri gibi antibiyotikler ise hücre zarı oluşumunu engeller. Bu nedenle gelişmekte olan hücrelere etkin, fakat gelişmesini tamamlamış hücrelere etkisizdir. Önceleri penisilin ve türevlerinin bu etkisinin, murain ağının oluşumunu engelleyecek şekilde olduğu sanılmakta idi. Buna neden, önceleri bu antibiyotiğin yalnızca gram-pozitif bakterilere etkin olduğu görüşünün bulunmasıydı. Fakat yapılan çalışmalar penisilinin gram-pozitif bakteriler kadar olmasa da gram-negatif bazı bakterilere de etkin olduğunu ve hücre zarı üzerine etkisinin daha değişik olması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu aşamada yapılan araştırmalar penisilin ve türevlerinin, hücre zarındaki peptit zincirlerinin enine bağlanmalarını engellediğini ve böylece zar oluşumunu önlediğini ortaya koymuştur.

#### **4. İZOLASYON YÖNTEMLERİ ve DOĞAL ORTAMLARDAN MİKROORGANİZMA İZOLASYONU**

Aslında izolasyon, yabancı bir sözcük olup, değişik anlamlar belirtirse de; mikrobiyolojide ayırma anlamına kullanılır. Böylece, farklı cins ve türden mikroorganizmaların oluşturduğu karışımdan tek bir türün diğerlerinden veya her bir tipin, tek tek ayrılarak, arı kültürlerin eldesi **izolasyon** olarak tanımlanmış olmaktadır.

Doğal ortamlar mikroorganizma ile bulaşıktır ve ortam koşullarına göre bulaşık mikroorganizmalar az veya çok sayıda, farklı özelliklere sahip türler olabilirler. İster eğitim ve araştırma amaçlı laboratuvar çalışmaları, isterse teknik amaçlı üretim çalışmaları olsun, çoğu mikrobiyolojik uygulamalar arı kültürün eldesini zorunlu kılar. Bu da farklı özellikteki türlerin, karışık ortamdan ayrılarak, diğer bulaşma etkenlerinden arıtılmasıyla sağlanabilir. Bu amaçla uygulanan teknikler izolasyon yöntemleri olarak tanımlanır. Mikrobiyolojik çalışmalarda yararlanılan izolasyon yöntemleri, aslında fazla sayıda olmakla birlikte; günümüzde sıklıkla kullanılanlar sürme ve dökme yöntemleri olarak ikiye ayrılabilir. Bu uygulamalar mikroorganizmaların havaya karşı durumları dikkate alınarak geliştirilmiştir. Örneğin, aerob mikroorganizmaların izolasyonu için sürme yöntemi; fakültatif anaerob, mikroaerofilik ve anaerob mikroorganizmaların izolasyonu için ise dökme yöntemi daha uygundur. Ayrıca, mikroorganizmanın doğal ortamda bulunduğu sayısal duruma göre de doğrudan izolasyon ve zenginleştirme tekniği ile izolasyon şeklinde de iki ayrı uygulamadan söz etmek kaçınılmazdır. Mikrobiyolojik çalışmalarda özellikle son iki yöntem büyük farklara sahiptir. Bu da farklı uygulamaları gerektirir.

Eğer mikroorganizma izolasyonu için kullanılan örnekte, izolasyonu amaçlanan mikroorganizmanın, besiyerinde birbirinden tümünden ayrı kolonilerin oluşumu için yapılacak yeterli seyreltme oranında, yeterli sayıda koloni oluşturup, rastlanma olasılığı bulunuyorsa, doğrudan izolasyonla sonuca gidilebilir. Bu durumda, kullanılan örnekten doğrudan bir tartım veya hacim alınarak, her petride 50-150 koloni oluşması tahmin edilen seyreltme oranına kadar fizyolojik su ilavesiyle çözüldürülüp seyreltilir ve buradan ekim yapılır. Ekim ya yüzeye sürme veya petriye dökme şeklinde gerçekleştirilir.

#### **4.1. Zenginleştirme**

Zenginleştirme kültürü yöntemiyle izolasyonda asıl amaç, izolasyonu düşünülen mikroorganizma türünü, ortamı paylaştığı diğer türlerden kolayca ayırmak ve karışık ortamda doğal olarak azınlıkta bulunan bir türü çoğunluğa taşımaktır. Örneğin, doğal olarak bulaşmış bir örnek (toprak, besin, bitkisel veya hayvansal materyal) aynı anda bakteri, maya ve küflerle bulaşıktır. Bu tür bir örnekte bakteri izolasyonu amaçlanmış ise; doğrudan izolasyonla sonuca gitmek çok zordur. Çünkü, maya ve küfler bakterilerden daha hızlı gelişecekler ve bakteri kolonilerini kapatacaklardır. Benzer şekilde, yalnızca bakterilerle bulaşık bir örnekten doğrudan izolasyonda, karışımı oluşturan türler birbirine yakın oranda iseler, bunların oluşturacağı koloniler de yaklaşık aynı oranı koruyacağı için, istenilen türe ait koloninin

belirlenmesi zor olacak ve çok sayıda koloninin mikroskopik incelenmesi gerekecektir. Bir de, araştırılması amaçlanan tür, karışık ortamda diğer türlere göre azınlıkta kalıyorsa, uygun koloni sayısına ulaşmak için yapılacak seyreltmelerde, bu tür daha da azalacak ve rastlanma olasılığı ortadan kalkabilecektir. İşte bu sakıncaları bir ölçüde de olsa giderebilmek için, izolasyona başlarken doğal örneklerle, amaca uygun özelliklerde bir sıvı besiyerine aşılama yapılarak, amaçlanan türün etkinleşmesini ve çoğunluğa geçmesini sağlamak için oluşturulan kültüre zenginleştirme kültürü denir. Bu uygulama **zenginleştirme**, özel olarak belirlenen koşullar ise **zenginleştirme koşulları** olarak tanımlanır.

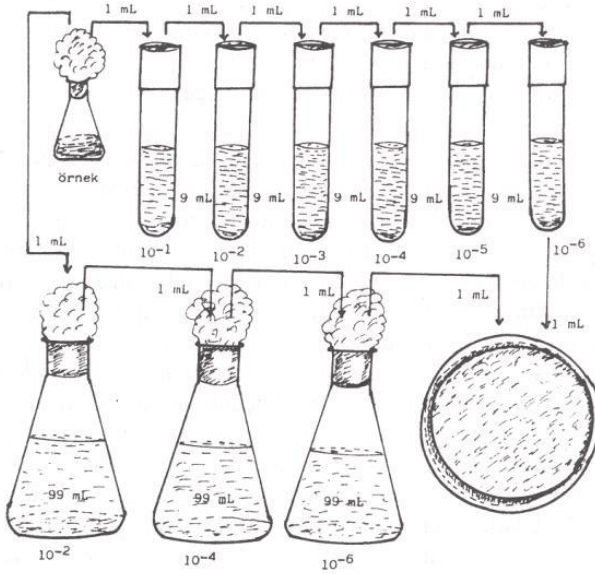
Zenginleştirme koşulları, mikroorganizmanın özel isteklerine uygun olarak sağlanacak, enerji, karbonlu bileşikler, azotlu maddeler, hidrojen verici bileşikler, sıcaklık, pH, ışıklandırma ve ortam havasının bileşimi gibi besin öğeleri veya gelişme koşulları olabilir. Ayrıca, ortama ilave edilecek, belirli tür dışında kalan mikroorganizmaların gelişmesini engelleyecek maddeler de sıklıkla uygulama bulur. Bunlardan, tuza, ışınlamaya, aside ve alkaliye dayanıklılık da seçici koşullar olarak kullanılabilir. Örneğin, asit özellikte besiyerlerinde, aerob koşullarda laktik asit bakterileri gelişirken, aerob gelişme yeteneğindeki diğer bakteriler yeterince gelişemez. Seçici olarak hazırlanan besiyerlerinden, patojen mikroorganizmaların tanısında hekimlikte de yararlanılmaktadır. Yine karışık ortamlarda, gram pozitif bakterilerin gelişmesini engellemek için besiyerine penisilin; maya veya mantar gelişmesini engellemek için ise sikloheksamid ilavesinden yararlanılabilir. Yöntem veya katkı ne olursa olsun, amaç karışık ortamda bulunan veya bulunduğu tahmin edilen bir mikroorganizmayı baskın ve etkin duruma geçirmektedir.

Doğal kaynaklarda baskın olan veya zenginleştirme kültürü ile baskın duruma getirilen mikroorganizmayı, birlikte bulunduğu diğer mikroorganizmalardan ayırarak, arı kültür haline getirme işlemi izolasyon olarak tanımlanır. Günümüzde izolasyon çalışmaları, daha çok agar katımı ile katılaştırılmış besiyerleri kullanılarak, petri kültürü tekniği ile gerçekleştirilir. Bu çalışma sırasında asıl amaç, birbirinden ayrılmış olan, farklı türe ait hücrelerin her birinin diğerinden yeterli uzaklıkta bir noktada bulunması ve çoğalarak katı ortamda koloni oluşturmasıdır. Bu da her petride 30-100 koloni gelişmesi ile sağlanabilir. Bazı araştırmacılara göre, petri içinde oluşan koloniler 150'nin üzerine çıkarsa, koloniler arasındaki aralık azalarak her koloniden arı örnek alımını güçleştirir veya olanaksızlaştırır. Petride oluşan koloni sayısı azaldıkça, koloniler arası aralık artacağından, her bir koloniden örnek alımı kolaylaşır ve bulaşma olasılığı azalır. Ancak, bu sayının 50'nin, özellikle 30'un altına düşmesi, karışık kültürde daha az oranda bulunan mikroorganizmanın, seyreltme sırasında petriye taşınması ve petride koloni oluşturarak saf kültüre alınması olasılığını azaltır.

## 4.2. İzolasyon Uygulamaları

### 4.2.1. Seyreltme

İzolasyon sürme ve dökme tekniği olarak tanımlanan iki ayrı uygulama ile gerçekleştirilir. Her iki uygulamada da önce, örnekteki mikroorganizma sayısını, petri kabında uygun sayıda koloni oluşturacak düzeye indirmek üzere seyreltme uygulanması gerekir. Bunun için steril fizyolojik su kullanılır. Fizyolojik su 8.5 g/L saf NaCl içeren tuz çözeltisi demektir. Damıtık suda, belirtilen miktara göre, yeterli tuz çözündürüldükten sonra, ya normal boyutlardaki (16x160 mm) tüplere tam 9'ar mL veya 100 mL'lik edenlere tam 99'ar mL olacak şekilde pipetlenir. Ağızları hidrofob pamukla veya folyo ile kapatılıp, 121°C' de 15-20 dakika sterilize edilir. Seyreltme işlemi, genelde 1 mL'lik, steril pipetler kullanılarak, örnekteki var olan mikroorganizma tahmini sayısı dikkate alınarak Şekil 4.1' de şematize edildiği şekilde uygulanır.



Şekil 4.1. Seyreltme uygulaması ve oranları

### 4.2.2. Dökme yöntemiyle izolasyon

Şekilde görüldüğü gibi, son seyreltme kademesinden alınan 1 mL aşılama materyali, steril bir petrinin bir yarısına pipetlenir. Önceden tüp içinde sterilize edilmiş ve sıvılaştırıldıktan sonra, yaklaşık 48-50°C'ye soğutulmuş besiyeri aynı petriye, aşılama örneğinin bulunduğu yarının tersi yönünden, bulaşmaya izin vermeyecek şekilde dökülür.

Zaman yitirmeksizin, agarlı besiyerinin katılaşmasına olanak vermeden, petri kabı, kapağa besiyeri bulaşmasına izin vermeyecek şekilde, üç kez saat göstergesi yönünde, üç kez tersi yönde veya 8 çiçek şeklide 5-6 kez döndürülerek; aşılama materyali ile agarlı besiyerinin tek düze karışması sağlanır ve düz bir yüzeyde katılaşmaya bırakılır. Katılaşmayı veya petri kabı yana eğildiğinde besiyerinin akışkanlığını kaybetmesini takiben, aşılama materyali ile petri kabı kapak üzerine ters çevrilir ve kurumasını engellemek için bir fanus altına veya deksikatöre konarak veyahutta poşete sarılarak inkübasyon dolabına yerleştirilir. İnkübasyon, termofil mikroorganizmalar için 45°C, mezofiller için 30°C civarında ve psikrofiller için 10-15°C arasında gerçekleştirilir. Seyreltme sonucu petri içindeki besiyerine bağımsız ve birbirinden uzak olarak dağılmış olan hücreler hızla çoğalmaya başlayarak koloniler oluştururlar ve 48-72 saat sonunda gözle görülüp, incelemeye alınacak büyüklükte hücre kümelerinden oluşan koloniler, aşılama ve karıştırma sırasında hücrenin bulunduğu yere göre besiyeri yüzeyinde veya içinde bulunabilir. Buna göre de **yüzey** kolonileri ve **derin** (iç) koloniler olarak tanımlanırlar. Eğer hücre, besiyeri alt yüzeyi ve petri tabanı iç yüzeyi ile temas halinde kalmışsa, burada iki yüzey arasında yayılan ve geniş alan işgal eden gelişme izlenir. Bu durum, özellikle derin kolonilerin incelenmesinde, yeniden koloniler arası bulaşmaya neden olacağı için istenmez ve engellenmesi için, aşılama işlemi sırasında, petri hareketleri ile besiyerinde karışımın güçlü hareketlerle yapılmasını gerektirir. Ayrıca, ayırma çalışması sırasında, son seyreltikten petri kabına aşılama materyalinin pipetlenmesini izleyen süreçte; sıcak, sıvı besiyerinin zaman geçirmeden, hemen ortama verilmesi ve karışımın sağlanması kaçınılmazdır. Bu kurala uyulmaz ve iki işlem arasında bir bekleme süresi geçerse, sürenin uzunluğuna göre, hücreler petri taban yüzeyine adeta tutunarak, besiyerine dağıtılmaları zorlaşır. Aerob ve fakültatif anaerob mikroorganizmaların izolasyonunda normal atmosfer koşullarında çalışır. Ancak, anaerob mikroorganizmalarla çalışırken, aşılama materyalinin petri tabanına anaerob kaplarda veya anaerob inkübasyon dolaplarında gelişmeye bırakılması kaçınılmazdır.

Oluşan koloniler yeterli büyüklüğe ulaştıkça, inkübasyon dolabından çıkarılan petri tabanları incelenmeye alınır. Önce yüzey ve derin koloniler ve birbirinden olabildiğince uzak koloniler incelenir. Şekil, renk ve büyüklük bakımından farklı, tek olarak gelişmiş, diğerlerinden uzak 3-5 koloni harflerle veya rakamlarla işaretlenir. Bunların çıplak gözle görülebilen özellikleri not edilir. Sonra, steril bir öze veya en uygunu iğne ile küçük bir parça alınarak mikroskopta, hücre şekli, aralığı ve morfolojik özellikleri incelenir. Aralığı güven veren ve morfolojik özellikleri ile çalışma amacına uygunluğu belirlenen kolonilerden, yatık agar üzerine sürme veya derin besiyerlerine batırma şeklinde aşılır. Uygun sıcaklıkta gelişmeye bırakılan bu tüp kültürler yeterli gelişmeye ulaştığında alınarak, buzdolabında saklanır ve gerekiyorsa tanı

işlemleri yapılır.

Seyreltme işleminin arkasından, petrilere dökme şeklinde aşılama, deneyimi az olan veya araştırmaya ilk başlanan durumlarda, seyreltme oranı tam olarak tahmin edilemeyebilir. Bu durumlarda başarıyı artırmak ve yeniden başa dönmeyi engelleyerek süreyi kısaltmak için, son seyreltme oranı yerine, son iki seyreltme oranlarından ayrı ayrı petrilere ekim yapılarak da çalışılabilir. Bu şekil bir uygulamada, gelişmeyi izleyen süreçte, koloni sayısı bakımından uygun olan petri kültürü ile çalışmanın izleyen aşamaları sürdürülür.

Dökme yöntemi ile çalışılması durumunda, bir başka uygulama şekli de seyreltmenin son veya son iki seviyesine gelindiğinde, steril petri yerine doğrudan sıvılaştırılmış ve 47-48°C'ye soğutulmuş besiyeri içeren tüplere aşılama yapılır. Tüpte bulunan belirli miktardaki, örneğin 10 mL sıvılaştırılmış ve belirtilen sıcaklıklara soğutulmuş agarlı besiyerine 0.1- 1 mL seyreltik örnek pipetlendikten sonra, hızla iki el ayası arasında çevrilen tüp içeriğinin tek düze karışımı sağlanır, steril petri kabına dökülür ve petri kabı içeriği sekiz veya ileri-geri hareketi ile yeniden karıştırılarak düz bir yüzeyde katılaşmaya bırakılır. İzleyen işlemler yukarıda açıklandığı gibidir. Bu uygulama şekli, hücrelerin petri yüzeyine tutunma olasılığını kaldırması, daha iyi bir karışım sağlaması gibi üstünlüklere sahiptir. Ancak, seyreltik materyal doğrudan sıcak durumdaki besiyerine ilave edildiği için, agarlı besiyerinin, hücrelerin sıcaklıktan olumsuz etkilenmeyeceği kadar soğutulmuş, tüpte veya boşaltma sırasında katılaşmaya başlamasına izin vermeyecek kadar da sıcak olması gerekir. Bu da deneyim ve özen gerektirir. Ayrıca, aşılama sonrası tüpün iki el ayası arasında döndürülerek karıştırılması, besiyerinin köpürmesine neden olmamalıdır. Yoksa, oluşacak köpük petri kabına hava kabarcıkları şeklinde taşınarak, katılaşma sırasında besiyerinde hava boşluklarının kalmasına ve çalışmanın zorlaşmasına yol açabilir.

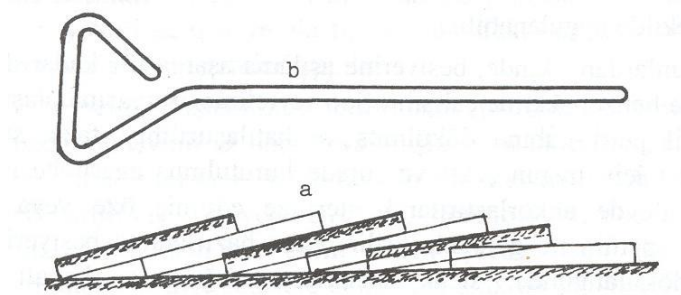
#### **4.2.3. Sürme yöntemiyle izolasyon**

Mikroorganizma izolasyonunda yukarıda ayrıntıları verilen dökme petri kültürü yanında, sürme petri kültürü yönteminden de yararlanılır. Hatta aerob mikroorganizmalarla çalışılırken bu yöntemin üstünlüğü de vardır. Bu da tüm hücrelerin üst yüzeye aşılansak, oksijen gereksinimlerinin kusursuz karşılanmasıdır. Sürme tekniği de iki ayrı şekilde uygulanabilir.

Bunlardan ilkinde, besiyerine aşılama aşamasına kadar dökme yöntemine benzer şekilde çalışılır. Son seyreltme aşamasına ulaşıldığında, steril petri kabına dökülmüş ve katılaştırılmış, fazla suyunu kaybetmesi için uygun şekil ve sürede kurutulmuş agarlı besiyerine aşılama, alevde akkorlaştırılarak sterilize edilmiş öze veya steril Drigalski spatülü

ile gerçekleştirilir. Taze hazırlanmış besiyeri petri kabına döküldüğünde, sıcak buharların soğuk ve kapalı petri yüzeylerinde yoğunlaşmasının sonucu olarak önemli ölçüde ıslaklığa sahiptir. Bu durumda aşılacak olursa, sürme sırasında yüzeyde hücrelerin sıvı katmanı içinde toplanmalarına ve ileri aşamada kolonilerden birbirine sıvı teması ile bulaşmalara yol açar. Bunu engellemek için, besiyeri petri kabına dökülüp katılaştıktan sonra, mikroorganizma yükü az veya en iyisi bulaşık olmayan hava içerikli bir ortamda, daha doğrusu inkübasyon dolabında, 37°C'de Şekil 35'de görüldüğü gibi kapak ve gövdeler ters çevrili şekilde dizilerek 2 saat kurumaya bırakılır. Sonra, bulaşmaya izin verilmeden kapak hızla ters çevrilerek, gövde ağzına konur. Yeterli seyreltme ile mikroorganizma yükü uygun düzeye indirgenmiş örnekten steril bir öze ile alınarak, petri kapağı yalnızca bir yandan aralanıp, öze karşı kenara kadar içeriye uzatıldıktan sonra zikzak çizerek besiyerinin bir yarısı aşılır. Öze dışarı çekilir, kapak kapatılarak petri 180°C döndürülür ve bu kez ters taraftan aralanan kaptan öze içeri uzatılarak, kenardan merkeze doğru ikinci yarı da sürme ve zikzak hareketi ile aşılır. Öze, mikroorganizma yükünü büyük ölçüde ilk yarım yüzeyde bırakacağı için, ikinci yarım yüzeyde daha seyrek koloni oluşması ve arı bir izolasyon sağlanır (Şekil 4.2 a).

Drigalski spatülü ile sürme yapılacaksa, kurutulmuş petri besiyerine, steril bir pipetle bir kaç damla veya 0.1-0.5 mL seyreltilmiş örnek pipetlenir. Drigalski spatülü, % 96'lık alkole (ispirto) batırılıp çıkarıldıktan sonra yüzeye bulaşan alkol tutuşturulur ve sönmesi beklenir. Alkole batırma ve tutuşturma 2-3 kez yinelenerek sterilizasyondan sonra petrinin kapağı yine bir yandan aralanıp, spatülün yayıcık kısmı (Şekil 4.2 b) petri içine sokulur ve pipetlenmiş örnek seyreltiği tüm yüzeye yayılır.



Şekil 4.2. Sürme şeklinde aşılacak besiyerlerinin kurutulması (a) ve sürme işleminde kullanılan Drigalski spatülü (b)

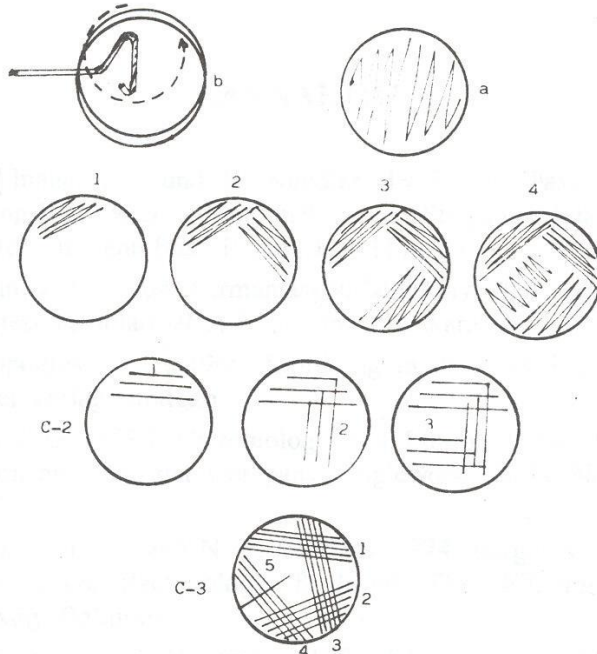
Her iki şekilde yüzeye sürme şeklinde aşılanan petriler dökme yönteminde olduğu gibi inkübasyona alınır,

Sürme yöntemiyle izolasyonun ikinci uygulamasında seyreltme işlemi yapılmaz.



Çünkü burada seyreltme petri kabındaki besiyerine aşılama sırasında gerçekleşir,

Uygun bileşimde besiyeri dökülerek katılaştırma ve kurutma işleminden sonra aşılama iğne ile yapılır, Bunun için değişik uygulama teknikleri vardır (Şekil 4.3). Alevde akkorlaştırılarak sterilize edilen aşı iğnesi ucu, izolasyon için hazırlanan zenginleştirme kültürüne veya aktif hücre gelişimi olan sıvı örneğe batırılır. Sonra petri kapağı bir kenarından aralanarak iğne içeriye sokulur ve karşı kenara yakın bir yerde kısa tek bir çizgi veya uzun, birbirine koşut bir kaç çizgi çizilir. İğne çıkarılır ve petri kapatılır. İğne alevde yeniden sterilize edilip, soğutulur ve petri kapağı bir yandan aralanarak, kısa tek çizgiden buna yaklaşık dik açıyla ikinci bir çizgi çekilir. Uzun ve çoklu çizgililerde, bu çizgilere dik ve bir uçta, yine birbirine koşut ve uzunca bir kaç çizgi çekilir. İğne yeniden sterilize edilir ve çoklu çizgi ile çalışılanlarda, ikinci grup çizgilerin, ilk çizgilere ters ucunda, bunlara dik, birbirine koşut çizgiler çizilerek aşılama sona erdirilir. Tek ve kısa çizgi ile başlanan petrilere, iğnenin sterilizasyonundan sonra, kısa çizgiye dik çizgiyi ortalayacak, fakat petrinin en az 1/3 'lük alanına geçmeyecek şekilde zikzaklar çizilir. İğne yeniden sterilize edilir ve bu kez petrinin boş kalan kısmında, birinci zikzaklara yalnızca uçlarda temas edilerek buna ters yönde ikinci zikzaklar çizilerek aşılama sona erdirilir. Böylece ilk çizgilerde yoğun bir mikroorganizma gelişmesi olurken. son çizgilerde birbirinden uzak, tek hücreden gelişmiş arı kolonilerin eldesi ve izolasyonun gerçekleştirilmesi sağlanmış olur.



Şekil 4.3. Değişik sürme teknikleri

a) Seyreltmeyi izleyen öze ile sürme, b) Seyreltmeyi izleyen Drigalski spatülü ile sürme. c) İğne ile seyreltmesiz

sürme.

Sürme yöntemiyle gelişmesi sağlanan koloniler de yeterli büyüklüğe ulaştığında önce gözle sonra mikroskopla incelenir ve özellikleri belirlenerek not edilir. Arı olduğuna ve amaca uygunluğuna inanılan kolonilerden sürme (yatkı) veya batırma kültürleri hazırlanarak, tanı işlemi veya kullanılmak amacıyla buzdolabında korumaya alınır.

## **5. Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Analize Hazırlanması**

### **Örneklerin Toplanması**

1. Parti aynı koşullar altında üretilen ve işlenen gıda materyalinin tamamı olarak tanımlanır. Pratikte bir parti mal fabrikada bir günde, bir vardiyada, ya da uygulanan temizlik ve dezenfeksiyon molaları arasında üretilen gıda materyali olabilir. Alan örnekleri toplanırken örneklerin parti numaraları mutlaka kaydedilmelidir. Parti numarası kaydedilmemiş bir örneğin mikrobiyolojik analiz sonuçlarının doğru bir şekilde değerlendirilmesi mümkün değildir.

2. Paketlenmiş gıdalarda örnek alma işlemi sırasında meydana gelebilecek herhangi bir kontaminasyonu önlemek amacıyla örnek orijinal paketiyle alınır.

3. Büyük hacimler içindeki gıdalardan aseptik olarak temsili bir örnek alınıp steril bir kaba konarak laboratuvara getirilmelidir.

4. Örneklerin alınması amacıyla kullanılan makas, spatul, pipet, kaşık gibi aletler daha önceden aliminyum folyoya sarılarak steril edilmeli ve bu şekilde muhafaza edilmelidir.

5. Örnek almak için kullanılan cam, paslanmaz çelik veya plastik kaplar ve plastik torbalar temiz, kuru, steril ve sızdırmaz, geniş ağızlı ayrıca örnek ünitesini alabilecek kapasitede olmalıdır. İdeal olarak örnek kapları toplam hacimin dörtte üçünden daha fazla doldurulmalıdır.

6. Büyük hacimdeki sıvılar örnek alınmadan önce çok iyi bir şekilde karıştırılmalı eğer bu mümkün değilse alınan örnek sayısı arttırılmalıdır.

7. Örnek almak için kullanılacak aletler daha önceden steril edilememişse bu durumda alkole batırılıp alevden geçirilerek kullanılabilir. Ancak bu bilginin etikette örnekle ilgili bilgiler arasına eklenmesi gerekir.

### **Örneklerin Laboratuvara Taşınması**

Örnekler laboratuvara mümkün olduğu kadar hızlı ve uygun koşullarda taşınmalıdır. Çabuk bozulabilen donmamış gıdalar 0 ile 4°C'ye soğutulmalı ve bu koşullarda laboratuvara getirilmelidir. Donmuş gıdalar analize alınmaya kadar donmuş durumda muhafaza edilmeli, kurutulmuş ve konserve gıdalar ise 45°C'nin üzerindeki ortamlarda tutulmamalıdır.

### **Örneklerin Analize Hazırlanması**

1. Öncelikle laboratuvara getirilen alan örneğinden analize alınacak örnek miktarı tartılmalıdır.

2. Donmuş örnekler analize alınmadan önce çözündürülmelidir. Bu işlem buzdolabında 18 saatte ya da eğer mümkünse 45°C'nin altında 15 dakika içinde yapılmalıdır. Bu işlem 20-25°C de akan suyun altında da yapılabilir.

3. Örnek ünitesi alınmadan önce tüm örnekler iyice karıştırılmalıdır. Karıştırma işlemi kuru örneklerde bir spatül veya kaşık yardımıyla, sıvı örneklerde ise çalkalama yardımıyla yapılabilir.

4. Analize alınacak örnek ünitesi en az 10 gram olmalıdır. Bazı analizlerde bu miktar 25 ya da 50 grama çıkabilir.

5. Örnek ünitesi tartıldıktan sonra ya steril bir blendırda 8000 rpm de 2 dakika yada stomacherda 30-60 saniye homojenize edilir. Sıvı örneklerin homojenizasyonu için çalkalama yeterlidir. Bu şekilde 10 gram örnek 90 mililitre dilüsyon sıvısı içinde homojenize edildiğinde  $10^{-1}$  dilüsyon elde edilmektedir. Bu ilk dilüsyondan aynı dilüsyon sıvıları kullanılarak diğer desimal dilüsyonlar hazırlanır.

6. Örnek ünitesi tartıldıktan sonra örneklerin geri kalan kısmı analiz sonucu elde edilene kadar buzdolabında muhafaza edilmelidir. Ancak kuru örnekler oda sıcaklığında muhafaza edilebilir.

7. Dilüsyon hazırlamak amacıyla genellikle fosfat tamponu % 0,1 lik peptonlu su veya ringer çözeltisi kullanılabilir.

## **6. Besiyerleri**

### **Besiyeri Hazırlama Şekilleri**

Standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı tipik bir ev mutfağına benzer. Besiyeri hazırlamak ise, evde yemek yapmaktan çok farklı değildir. Mikrobiyolojik amaçla kullanılacak bir besiyerinin hazırlanması çok basit olarak mutfakta çorba yapmaya

benzetilebilir. Örneğin, domates çorbası yapmak için yemek kitaplarında miktarları verilerek tarif edildiği şekli ile; önce un yağda kavrulur, üzerine domates suyu, süt ve tuz ilave edilir, pişirilerek "çorba" hazırlanır. Ya da daha basit olarak, hazır toz haldeki domates çorbası belirli miktarda su ile pişirilir.

Benzer şekilde, besiyeri bileşimine giren maddeler ayrı ayrı tartılarak, ya da hazır dehidre besiyeri doğrudan tartılarak su içinde çözülür. En basit olarak; Nutrient Broth'un bileşimi litrede 5 gram pepton ve 3 gram et ekstraktı şeklindedir. Laboratuvarında pepton ve et ekstraktı varsa, bunlar doğrudan tartılıp, 1 litre damıtık su içinde çözülür ve gerekli büyüklükteki cam kaplara dağıtılarak sterilize edilir. Laboratuvarında hazır dehidre Nutrient Broth varsa, bundan 8 gram tartılarak, 1 litre damıtık su içinde çözülür ve yukarıdaki işleme devam edilir. Nutrient Broth gibi basit bir besiyerine giren maddeler, çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında her zaman "el altında" bulunur. Dolayısı ile, Nutrient Broth'u bileşimden hazırlamak genellikle sorun değildir. Ancak, yabani maya izolasyonu ve sayımında kullanılan Lysine Medium besiyerinde 25 madde olduğu, bunlar arasında 0,000001 g/L folik asit gibi tartımın da bulunduğu dikkate alındığında, bu tip besiyerlerini standart bir mikrobiyoloji laboratuvarında bileşimden hazırlamanın kolay ve günlük uygulamada hiçbir şekilde pratik olmadığı ortaya çıkar. *Alicyclobacillus* spp. aranmasında kullanılan BAT Agar ile özellikle *Listeria monocytogenes* aranmasında kullanılan ALOA Agar besiyerlerinin de standart bir laboratuvarında bileşimden hazırlanması oldukça güçtür. Kuşkusuz, bileşimine 2 madde giren Nutrient Broth ile bileşimine 25 madde giren Lysine Medium besiyerleri uç noktalarda örneklendirilen besiyerleridir.

Besiyerinin bileşimi ister basit, ister kompleks olsun, bileşimden hazırlamak yerine dehidre hazır besiyeri kullanmanın 3 önemli üstünlüğü vardır:

-Her maddeyi ayrı ayrı tartmak yerine hazır besiyerinden 1 kez tartım yapmak çok daha kolay ve güvenilir bir uygulamadır.

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

-Hazır besiyeri kullanmanın en önemli üstünlüğü -hatta bir diğer deyiş ile zorunluluğu- bileşenlerin performansı ile ilgilidir. Ayrı ayrı tartılan bileşenlerden birisinin dahi özelliğini yitirmiş olması, o madde ile hazırlanan besiyerinin performansında kayda değer ölçüde kayba, hatta o besiyerinin tümüyle kullanılamaz hale gelmesine yol açar.

Besiyerlerinin bileşimine çok genel bir ortalama olarak 5-7 madde girer. Laboratuvarında bulunabilen bu bileşenlerin tümünün yeterli performans göstermesi

beklenmemelidir. Özellikle organik bileşenlerin depolanma ömürleri anorganik maddelere göre çok daha kısadır. Buna göre bileşenlerin bir ya da bir kısmının performansında kayda değer düşme olmuş ise, bu düşüş doğrudan besiyeri performansına yansıyacaktır.

### **Formülden Hazırlama**

Yukarıda çeşitli örnekleri verildiği gibi besiyeri bileşenlerinin ayrı ayrı tartılarak besiyerinin hazırlanma şeklidir. Genel olarak önerilen bir yöntem olmamakla birlikte, aşağıda verilen 2 koşulda besiyerinin bileşim üzerinden hazırlanması bir anlamda zorunludur:

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

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

Besiyerinin bileşimden hazırlanması gerektiğinde, bazen bileşime giren malzemelerin tümü formülde verildiği şekli ile laboratuvarında bulunmaz. Örneğin, laktik asit bakterileri için kullanılan MRS Agar besiyerinin formülünde  $MgSO_4$  0,2 g/L olarak verilmektedir. Laboratuvarın kimyasal madde deposunda  $MgSO_4$  yok, ama bunun yerine  $MgSO_4 \cdot 6H_2O$  varsa molekül ağırlığı üzerinden hesaplanarak kullanılabilir.  $MgSO_4$ 'ın molekül ağırlığı Mg: 24; S: 32; O: 16 (4 atom oksijen olduğuna göre  $4 \times 16 = 64$ ) olmak üzere 120 mol gramdır.  $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ 'da ise, ilave 6 su olduğuna göre molekül ağırlığı  $120 + 108 = 228$  mol gram olarak hesaplanır.

İkinci aşamada basit orantı kurulur:

Mol ağırlığı 120 olan maddeden 0,20 gram gerekiyorsa

Mol ağırlığı 228 olan maddeden 0,38 gram gerekir.

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

### **Dehidre Besiyerlerinden Hazırlama**

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

## **Kullanıma Hazır Besiyerleri**

1950'li yıllardan bu yana, bazı besiyeri üreticisi firmalar tarafından kullanıma hazır halde besiyerleri üretilmekte ve pazarlanmaktadır. Bunlar, vida kapaklı tüp ve şişelerde sıvı ve katı besiyerleri ile oldukça yaygın olarak Petri kutularında agarlı besiyerleridir. Genellikle, plastik Petri kutularında hazırlanan agarlı besiyerleri sadece tek çeşit besiyerini içerebileceği gibi, iki ya da üçe bölünmüş kutularda farklı besiyerleri de bulunabilmektedir. Bunlar içinde en yaygın kullanılanlardan biri Kanlı (Blood) Agardır.

Yüzey kontaminasyonlarının belirlenmesi ve/veya kültürlerin taşınmasında kullanılan hazır agar slaytları da bulunmaktadır. Bu hazır besiyerlerinin 2 farklı yüzünde 2 farklı besiyeri bulunan tipleri aynı örnekte hem toplam bakteri hem de koliform grup bakteri analizine olanak sağlamaktadır. Bunların bir yüzü maya-küf, diğer yüzü toplam bakteri vb. çeşitleri de vardır. Bu tip besiyerlerini kullanmak işletme laboratuvarında büyük kolaylık sağlamaktadır.

Mikrobiyolojide, başta sayım ve var/yok testlerinde kullanılmak üzere çeşitli amaçlarla membran filtreler kullanılmaktadır. Örneğin, içme ve kullanma sularında *E. coli* aranması ya da sayılması için en yaygın uygulamalardan biri, su örneğinin membran filtreden geçirilip, bu filtrenin uygun bir katı besiyerine yerleştirilerek inkübasyona bırakılmasıdır. Burada, amaca uygun bir şekilde hazırlanmış ve Petri kutusuna dökülmüş bir katı besiyeri kullanılabileceği gibi, bu amaçla hazırlanmış özel besiyerleri de kullanılabilir. Bu tip besiyerleri uygun bir pede emdirilmiş, kurutulmuş ve plastik bir kutu içine konularak sterilize edilmiş bir şekilde pazarlanmaktadır. Kullanıcı için yapılacak tek işlem pedi steril su ile ıslatmak ve filtreyi bu pede yerleştirerek inkübasyona bırakmaktır.

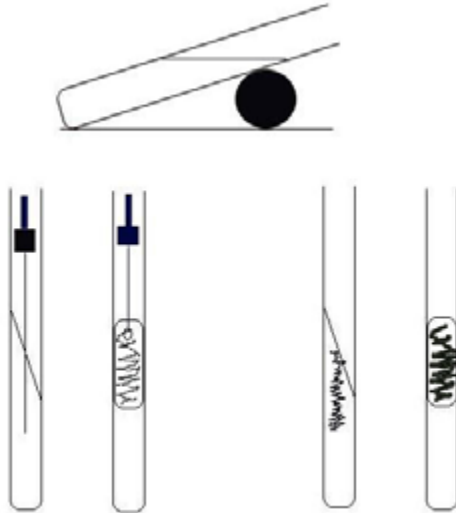
Kullanıma hazır besiyerleri içinde bir diğer yaklaşım gama radyasyonu ile sterilize edilmiş dehidre besiyerleridir. Bunlardan ışınlanmış Tryptic Soy Broth, genellikle serum gibi steril olması gereken tıbbi malzemedeki sterilite testi yapmak için kullanılır. Serum içine steril koşullarda ilave edilen besiyeri kolaylıkla erir ve inkübasyon sonunda bulanıklık oluşursa serumun steril olmadığı anlaşılır. Bu testin mantığı, steril dehidre besiyerini, steril kap içinde, steril olması gereken sıvı ile çözerek bir çeşit besiyeri hazırlamaktır. Membran filtrasyon sisteminde bazı sporlar ile *Hydrogenophaga pseudoflava* (Syn. *Pseudomonas pseudoflava*) gibi küçük bakteriler ve *Acholeplasma laidlawii* gibi mikoplazmalar 0,1µ porlu membran filtrelerden geçebilir ve bu nedenle membran filtre tekniği ile bu gibi bakterilerin varlığı fark edilemez. Işınlanmış Tryptic Soy Broth yönteminde ise böyle bir olumsuzluk yoktur.

## **Özel Uygulamalar**

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

**Çift kuvvetli broth:** EMS ile yapılan sayımda 10 mL besiyerine 10 mL örnek aktarıldığında, besiyerinin konsantrasyonu yarı yarıya azalır ve burada sağlıklı bir mikrobiyel gelişme olmaz. Bunun önüne geçmek için, 10 mL gıda örneği (homojenizat) ilave edilecek tüplerde, başlangıçta bu besiyerleri çift kuvvette (2 misli konsantrasyonda) hazırlanır. Örneğin, koliform grup bakteri analizinde kullanılan LST Broth besiyeri normal olarak 35,5 g/L konsantrasyonda hazırlandığında, 10 mL tüp içinde 0,355 g madde vardır. Çift kuvvetle hazırlanması gerektiğinde, başlangıçta 71 g/L (0,71 g/10 mL) olarak hazırlanır, bunun üzerine 10 mL örnek konulduğunda LST konsantrasyonu 0,71 g/10 mL'den 0,355 g/10 mL standart değere iner. Bu tip ekimler için yeteri büyüklükte tüp kullanılmalıdır.

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



**Roux Şişesi:** Genel olarak, çok miktarda mikroorganizma kültürü elde etmek amacı ile kullanılır. Yüzey alanı 250 cm<sup>2</sup> kadardır. Buna göre 100 mL kadar agarlı besiyeri ile birlikte sterilize edilir. Otoklav sonrasında düzgün bir yere yatırılarak agarın donması sağlanır. Geniş

ağzından sürme (svap) çubuğu yardımı ile yoğun bir inokülasyon yapılabilir. İnkübasyon sonrası yıkama ile kültür elde edilir. Bu işlem, hasat (harvesting) olarak da adlandırılır.

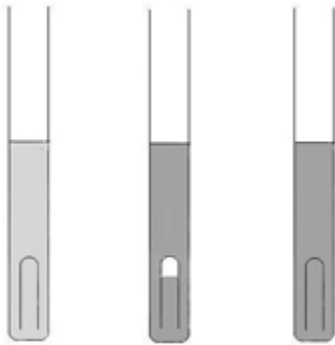


Üstten görünüş



Karşıdan görünüş

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



(+)

(-)

**Çift Kat Ekim:** Koliform grup bakteri ekiminde yaygın olarak uygulanır. Yayma ya da dökme yöntemiyle standart ekimde; dökme yönteminde besiyerinin tam jelleşmesinden sonra, yayma yönteminde ise besiyerinin yayılan kültürü tam emmesi için 10 dakika beklendikten sonra üzerine 4–5 mL kadar ikinci kat besiyeri dökülür. Bu uygulamada genellikle aynı besiyeri kullanılmakla beraber, özel çalışmalar amacıyla farklı bir besiyeri de kullanılabilir. Temel amaç, kısmi bir mikroaerofil ortam yaratmaktır. Bu amaçla toplam bakteri sayımında da çift kat ekim yapılabilir. Başta basiller olmak üzere aerobik bakteriler bu ortamda yine gelişir, ancak yayılıcı koloni oluşturamazlar. Eğer toplam bakteri analizinde çift kat ekim yapıldı ise analiz raporunda bu durum belirtilmelidir.



## Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler

Katı besiyeri kullanılarak yapılan sayımın prensibi "her canlı hücrenin belirli bir inkübasyon sonunda 1 adet koloni oluşturması"dır. Bununla birlikte, 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 (colony forming unit; cfu)" olarak verilmektedir. Katı besiyeri kullanılan standart yöntemler dökme, yayma ve damlatma olarak üç ana grupta ele alınır.

Bunlardan dökme yönteminin uygulanışında, steril Petri kutusuna analizi yapılacak sıvı gıda maddesinden doğrudan ya da uygun seyreltisinden 1 mL aktarılıp, üzerine donma sıcaklığının biraz üzerinde (yaklaşık 45°C) agarlı besiyeri dökülür ve karıştırılır. Agar donunca Petri kutusu inkübasyona bırakılır.

Yayma yönteminde ise, Petri kutusuna önce agarlı besiyeri dökülür, katılaştıktan sonra sıvı gıda maddesinden doğrudan ya da uygun seyreltisinden 0,1 mL aktarılıp, "Drigalski spatülü" olarak adlandırılan cam çubuk ile yayılır. Drigalski spatülünün metal ya da tek kullanımlık olanları da vardır. Gıdadaki mikroorganizma sayısı bu yöntemin kullanılacağı kadar yüksek ise, dökme yöntemine tercih edilmelidir. Bu konuda, analiz edilecek gıdadaki mikroorganizma sayısı bağlayıcı olmakla beraber, laboratuvarın tercihleri de önemlidir.

Damlatma yönteminde, daha önceden dökülüp katılaşmış besiyerine 10 µL (0,01 mL) damlatılır ve kendi halinde kurumaya bırakılır. Potato Dextrose Agar gibi besiyerleri damlayı çok iyi emdiği için, 50 µL damlatma yapılabilir. Kuruma sırasında yaklaşık 2 cm çaplı bir daire içinde oluşan koloniler genellikle büyüteç altında sayılır. Bu yöntemin en büyük avantajı tek Petri kutusu üzerine 4–6 damla aktarılması, diğer bir deyiş ile, besiyerinden 4–6 misli tasarruftur. Ancak, kolonilerin sağlıklı bir şekilde sayılamaması nedeni ile hiçbir koşulda günlük analizde kullanılmaz. Zorunlu hallerde titre belirlenmesi için kullanılabilir.

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

-Petri kutusuna dökme yönteminde 1 mL, yayma yönteminde 0,1 mL örnek aktarıldığı için, dökme yöntemi yayma yönteminden 10 misli daha duyarlıdır. Örneğin, katı bir gıdada 10 kob/g düzeyinde *S. aureus* bulunmasına izin veriliyorsa ve o gıdada 30 kob/g *S. aureus* varsa,  $10^{-1}$  seyreltinin 1 mL'sinde 3 adet *S. aureus* olacaktır. Dökme yönteminde 1 mL kullanıldığına göre Petri kutusunda 3 koloni oluşacak ve seyreltme faktörü ile çarpılarak 1 gramda 30 sayısına ulaşılabilecektir. Aynı örnek yayma yöntemi ile ekildiğinde 0,1 mL içinde 1 adet *S. aureus* olma şansı sadece %30'dur. Buna göre inkübasyon sonunda %30 olasılıkla 1, %70

olasılıkla 0 koloni olacaktır. 1 koloni oluşur ise sonuç  $(1 \times 10 / 0,1)$  hesabı ile 100 kob/g, hiç koloni oluşmazsa 1 gramda 100'den daha az olarak verilecektir. Bu örneğe göre katı gıdalarda 100 adet/g, sıvı gıdalarda 10 adet/mL'den daha az sayıda mikroorganizma varsa, yayma yöntemi uygun değildir.

-Bununla beraber, 1 mL sıvının standart 3 Petri kutusuna yayılması ve 14 cm genişliğinde büyük Petri kutusuna doğrudan 1 mL aktarılıp yayılması gibi çözümler üretilmiştir.

-Dökme yönteminde mikroorganizmalar tüm besiyeri kütesine dağılır ve 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 aynı büyüklükte ve morfolojide koloni oluştururlar. Bu açıdan değerlendirildiğinde yayma yöntemi avantajlıdır.

-Yaygın kullanım alanı olmamakla beraber,  $10^{-1}$  seyreltiden 4 adet boş steril Petri kutusuna toplam 10 mL'nin dağıtılması ve üzerlerine 15'er mL kadar besiyeri dökülmesi ile fiilen 1 gram katı gıda analiz edilmiş olur.

-Dökme yönteminde agarlı besiyeri çok sıcak olursa, termal şok nedeni ile mikroorganizmaya zarar verebilir. Çok soğuk olursa, dökme sırasında besiyeri katılaştır ve iyi bir karıştırma sağlanamayabilir. Besiyeri sıcaklığı optimum olsa bile besiyeri ile çözeltinin homojen karışmasını sağlamak el deneyimi gerektirir. Buna bağlı olarak da dökme yönteminde kullanılacak agarlı besiyerleri en fazla 250 mL olarak hazırlanmalıdır. Yayma yönteminde bu gibi sorunlar yoktur, cam çubuk ile daha homojen bir dağılım sağlanır.

-Yayma yönteminde, besiyeri Petri kutusuna döküldükten sonra bir süre yüzeyin kurumaması beklenmelidir. Oysa dökme yönteminde böyle bir sorun yoktur. Dolayısıyla acil ekimlerde stokta önceden dökülmüş hazır besiyeri yoksa ve bu nedenle yeterince kurumamış besiyeri kullanılırsa kolonilerde yayılma oluşabilir. Yayma yönteminde, stok Petri kutularının organizasyonu kolaylıkla sağlanabilir. Dökme yönteminde ise, besiyeri sterilize edildikten sonra erlende katılaştırılıp stoklanır ise yeniden eritmek gerekir. Bu işlem, besiyerine zarar verebilir. Ayrıca her besiyeri bu şekilde yeniden eritilemez.

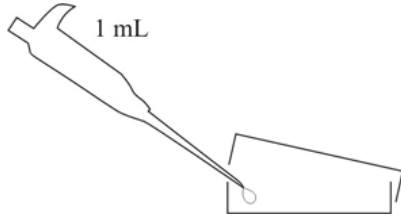
-Yayma yönteminde kullanılan cam (bazen metal) çubuğun sterilizasyonu alkol ile yapılmaktadır. Alkol, konsantrasyon düşmesi sonucu sterilizasyon etkisini göstermez ve kontaminasyona neden olabilir. Dökme yönteminde alkolden ya da Drigalski spatülünden gelebilecek bir kontaminasyon riski yoktur. Buna karşı, disposal steril plastik Drigalski spatülü kullanılabilir.

Bu açıklamalardan görüldüğü gibi, her iki yöntemin de birbirlerine göre üstün tarafları vardır. Genel olarak gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı günlük analizlerinde yayma yöntemi ile çalışılır. Yukarıda da belirtildiği gibi, sıvı gıdada az sayıda mikroorganizma olduğu tahmin ediliyorsa, herhangi bir seyreltme yapılmadan doğrudan analiz için kullanılır. Katı gıda mutlaka uygun bir seyreltme çözeltisinde homojenize edilmiş olmalıdır.

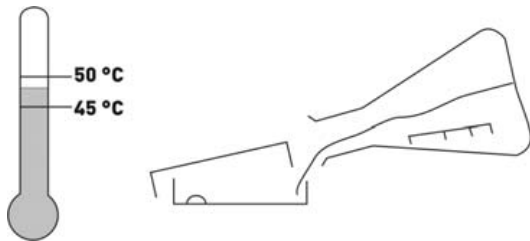
Yayma yönteminde 0,1 mL pipetlenmesinin nedeni, besiyerinin daha fazla hacmi emmemesi değil, sadece hesap kolaylığıdır. Böylece 0,1 mL aktarıma sonunda koloni sayısı basit olarak 10 ile çarpılarak seyreltme çözeltisinin 1 mL'sindeki sayı bulunup, seyreltme faktörü ile çarpılarak orijinal örnekteki sayı hesaplanır.

### **Dökme Yöntemi Uygulanışı**

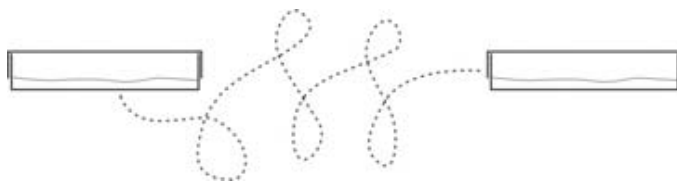
Steril Petri kutusuna önce 1 mL örnek (sıvı gıda, homojenizati ya da uygun bir seyreltisi) -kontaminasyon olmamasına özen gösterilerek- aktarılır. Petri kutusu tabanlarına önceden gerekli tüm bilgiler yazılmış olmalıdır. Sayım için ardışık 2 seyreltiden paralel ekim yapılır.



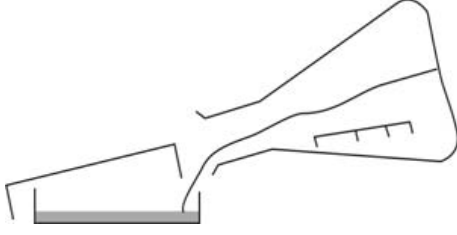
Üzerine 45–50°C'da tutulan steril besiyerinden, en az 2 mm kalınlık oluşturacak şekilde dökülür. Standart Petri kutuları için bu miktar 12–15 mL kadardır. Besiyeri dökme sıcaklığı çok kritiktir. Daha sıcak ya da daha soğuk olmamalıdır.



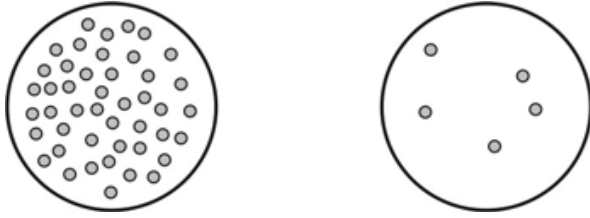
Besiyeri döküldükten hemen sonra düzgün bir zeminde ve dikkatli bir şekilde 888 çizilerek Petri kutusuna aktarılmış örnek ile besiyerinin tam olarak karışması sağlanır. Petri kutuları düzgün bir zeminde kendi halinde jelleşmeye bırakılır.



Gerekirse, 45–50°C'da tutulan 2. kat besiyerinden 5 mL kadar dökülür ve kendi halinde jelleşmeye bırakılır. 2. kat döküm standart uygulamada yoktur, koliform grup analizi gibi bazı özel analizlerde yapılır. 2. katın da tam olarak jelleşmesi beklenir.

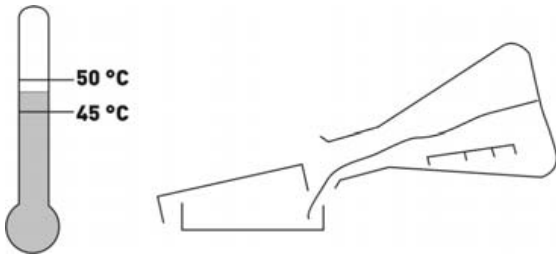


İnkübasyondan sonra Petri kutuları sayım, var/yok analizlerine uygun bir şekilde değerlendirilir. Analizden sonra, ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize edilir ya da uygun bir kimyasal madde ile dezenfekte edilir. Daha sonra bu malzeme yıkanır ya da atılır.

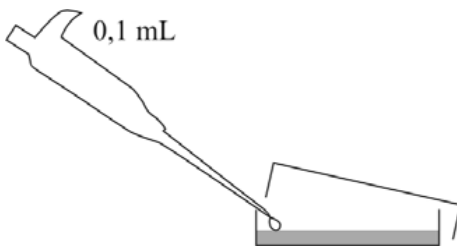


#### Yayma Yöntemi Uygulanışı

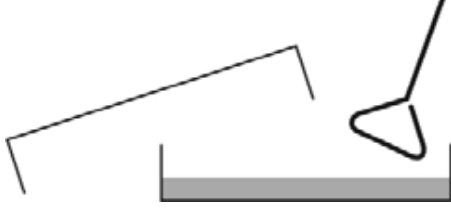
Steril Petri kutularına önce steril besiyeri en az 2 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülür (standart Petri kutuları için 12–15 mL). Besiyeri dökme sıcaklığı 45–50 °C olmalıdır. Ekim öncesi yüzey, yeterli bir şekilde kurutulmalıdır. Yüzey aşırı nemli ya da çok kuru olmamalıdır.



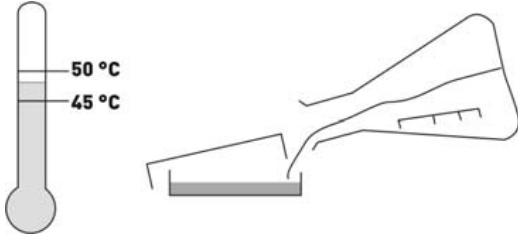
Bunun üzerine 0,1 (0,33; 1,0) mL örnek (sıvı gıda, homojenizatı veya uygun seyreltisi) -kontaminasyon olmamasına özen gösterilerek- aktarılır. Önceden dökülüp, depolanmış olan besiyerleri kullanılabilir. Petri kutusunun tabanına daha önceden gerekli tüm bilgilerin yazılmış olması gerekir.



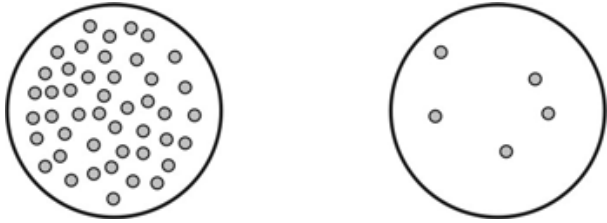
Örnek aktarımından hemen sonra alkolde en az 2 dakika bekletilerek sterilize edilmiş Drigalski spatülü ile besiyeri yüzeyine homojen bir şekilde yayılır. Drigalski spatülü, bunzen beki alevinden hafifçe geçirilerek alkolü uzaklaştırılmış olmalıdır. Disposal spatül kullanılabilir.



Gerekirse, 45–50°C'da tutulan 2. kat besiyerinden 5 mL kadar dökülür ve düzgün bir zeminde kendi halinde jelleşmeye bırakılır. 2. kat döküm standart uygulamada yoktur, koliform grup analizi gibi bazı özel analizlerde yapılan bir uygulamadır.



İnkübasyondan sonra Petri kutuları sayım, var/yok analizlerine uygun bir şekilde değerlendirilir. Analizden sonra, ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize ya da uygun bir kimyasal madde ile dezenfekte edilir. Daha sonra bu malzeme yıkanır ya da atılır.



### **Koloni Sayısının Hesaplanması**

İnkübasyon sonunda Petri kutularında sayım hızla yapılmalıdır. Herhangi bir nedenle inkübasyon sonrasında sayım yapılamayacak ise, Petri kutuları +4°C'da en fazla 24 saat depolanabilir. Daha uzun süre ile depolanmış Petri kutularında sayım yapılma zorunluluğu varsa, elde edilecek sonuçlar güvenilir değildir ve analiz raporlarında bu durum açıkça belirtilmelidir.

Daha önce 30–300 arasında koloni içeren seyreltilerdeki ekimler dikkate alınır iken, artık ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının ağırlıklı aritmetik ortalaması alınarak örnekteki sayı hesaplanır. Bu hesaplamada kullanılan formül;

$N = C / [V \times (n1 + 0,1 \times n2) \times d]$  şeklindedir. Burada;

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

C = Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V = Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim (mL)

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.

Bu formülde, 15–300 arasındaki koloni sayımları dikkate alınmaktadır. Farklı kaynaklarda 15–250, 25–250 vb. gibi farklı sınırlara da rastlanmaktadır. Ayrıca sayımı yapılacak mikroorganizmaya göre bu değer değişebilmektedir.

Örneğin FDA, süt ve ürünleri için PCA sayımlarında 25–250, VRB Agar sayımlarında 1–154 sınırlarını esas almaktadır. Maya–küf sayımlarında ise 15–150 olan Petri kutuları dikkate alınır.

Aşağıda bir sayım sonucunun değerlendirme örneği vardır.

Örnek: Yayma kültürel sayım yöntemi uygulanmış ve her seyreltiden 2 Petri kutusuna ekim yapılmış ve  $10^{-2}$  seyreltide 219 ve 185,  $10^{-3}$  seyreltide 28 ve 21 adet koloni elde edilmiştir.

Formüle göre;

$$C = 219 + 185 + 28 + 21 = 453$$

V = 0,1 (yayma kültürel sayım için Petri kutularına 0,1'er mL pipetlenmiştir)

n1= 2 (10–2 seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)

n2= 2 (10–3 seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)

d=  $10^{-2} = 0,01$  (ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır)

$$N = C / [V \times (n1 + 0,1 \times n2) \times d]$$

$$N = 453 / [0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}]$$

$$N = 453 / [0,1 (2,2 \times 0,01)]$$

$$N = 205.909,09$$

Bu değer, virgülden sonra 1 desimal ile gösterilmeli ve sonuç  $2,1 \times 10^5$  kob/g (sıvı ise kob/mL) olarak verilmelidir.

Yukarıdaki örnekte 15–250 koloni/Petri kutusu sınırında değerlendirilmiştir. Eğer 25–250 koloni sınırında değerlendirilirse, sonuç aşağıdaki gibi olacaktır:

$$C = 219 + 185 + 28 = 432$$

V = 0,1 (yayma kültürel sayım için Petri kutularına 0,1'er mL pipetlenmiştir)

n1= 2 (10–2 seyreltiden ekim yapılan 2 Petri değerlendirmeye alınmıştır)

n2= 1 (10–3 seyreltiden ekim yapılan 1 Petri değerlendirmeye alınmıştır)

$d = 10^{-2} = 0,01$  (ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır)

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

$$N = 432 / [0,1 \times (2 + 0,1 \times 1) \times 10^{-2}]$$

$$N = 432 / [0,1 (2,1 \times 0,01)]$$

$$N = 205.714,29; 2,1 \times 10^5$$

Görüldüğü gibi daha seyreltik olan ekimlerdeki Petri kutularının değerlendirilmeye alınması ya da alınmaması sayım sonucunu pek etkilememektedir. Benzer şekilde sırası ile 240, 260; 34, 41 koloni elde edilen sayım sonucu 25–250 sınırında değerlendirildiğinde  $2,6 \times 10^5$  sonucu alınacak, 30–300 sınırında yine  $2,6 \times 10^5$  değeri elde edilecektir.

Desimalin yuvarlatılması konusunda da farklı yaklaşımlar olabilmektedir. Standart olarak 205 sayısı 210 olarak yuvarlatılmakla beraber, yuvarlatılacak sayı 5 ise, bunun önündeki sayının tek ya da çift olmasına göre yuvarlatma, sırası ile yukarı ya da aşağı doğru yapılabilmektedir. Bu örnekte 205 sayısındaki "0" çift sayıldığı için yuvarlatma aşağı doğru yapıp, 200 olarak verilmektedir. Kuşkusuz, bu yönteme göre 195 sayısı da yuvarlatıldığı zaman 200 değeri elde edilmektedir. Bu uygulama, FDA tarafından benimsenmektedir. Her ne kadar mikrobiyolojik analiz sonucu olarak yukarıdaki örneklerde hesaplanan değer kullanılsa da, gerçek sayının bu olduğu beklenmemelidir. Petri kutusundaki koloni sayısı azaldıkça istatistik açıdan hata olasılığı artmakta, tersine olarak Petri kutularındaki koloni sayısı arttıkça bu tip hata olasılığı azalmaktadır. Ancak, bu kez sayım yapılırken hata oluşması ve bazı kolonilerin sayılmaması nedeni ile, üst sınır olarak mikroorganizmaya göre değişen değerler alınmaktadır. Sayım sonucu ile bulunan değerlerin %95 güvenlik sınırları ile alabileceği değerlerin hesaplanmasında kullanılan formül;

$$\delta = \{[(C / B) + (1,92 / B)] \pm [(1,96 \times \sqrt{C / B})]\} / d \text{ şeklindedir.}$$

Bu formülde B olarak gösterilen değer  $B = V(n_1 + 0,1 \times n_2)$  ile hesaplanır. 1,92 ve 1,96 değerleri istatistik sabitlerdir. Diğer birimler yukarıdaki formülde açıklanmıştır.

Yine yukarıda örnekteki  $2,1 \times 10^5$  kob/g değeri (yayma kültürel sayım;  $10^{-2}$  seyreltide 219 ve 185,  $10^{-3}$  seyreltide 28 ve 21 koloni) bu formüle göre;

$$B = 0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) = 0,22 \text{ ve}$$

$$C = 219 + 185 + 28 + 21 = 453 \text{ olmak üzere;}$$

$$\delta = \{[(453/0,22) + (1,92/0,22)] \pm [(1,96 \times \sqrt{453 / 0,22})]\} / 0,01$$

$$\delta = \{[2059,09 + 8,73] \pm [1,96 \times (21,28 / 0,22)]\} / 0,01$$

$$\delta = \{[2059,09 + 8,73] \pm [1,96 \times 96,73]\} / 0,01$$

$$\delta = \{[2067,82] \pm [189,59]\} / 0,01$$

$$\delta_1 = 2257,41 / 0,01 = 225.741 = 2,3 \times 10^5$$

$$\delta_2 = 1878,25 / 0,01 = 187.823 = 1,9 \times 10^5$$

olarak hesaplanır.

Bir diğer deyiş ile ilk formül ile elde edilen  $2,1 \times 10^5$  değeri %95 güvenlik sınırları içinde  $2,3 \times 10^5$  ile  $1,9 \times 10^5$  arasındaki bir değerdir ve yuvarlatma yapılmadan alınan  $N = 205.909$ ;  $\delta_1 = 225.741$ ;  $\delta_2 = 187.823$  değerleri kullanıldığında hata olasılığı;

$$[(225.741 / 205.909) - 1] \times 100 = +\%9,63 \text{ ve}$$

$$[(187.823 / 205.909) - 1] \times 100 = -\%8,78 \text{ olarak bulunur.}$$

15'ten az kolonilerin sayılmama kuralı dikkate alınmadan ve yukarıdaki örneğe yakın olarak; dökme kültürel sayımda  $10^{-3}$  seyreltiden 19 ve 16,  $10^{-4}$  seyreltiden 3 ve 2 koloni elde edildi ise sonuç 18.182 olarak alınacak,  $\delta_1 = 24.689$  ve  $\delta_2 = 13.420$  olarak hesaplanacak, hata sınırı ise "+ %35,8" ile "- %26,2" olarak bulunacaktır.

Sayımda 250, 300 gibi belirlenen üst sınırın üzerinde koloni varsa ve sayım yapılması zorunlu ise tercihen koloni sayacı ve mutlaka büyüteç kullanılarak  $1 \text{ cm}^2$  alan içinde kaç koloni olduğuna bakılır. Ortalama olarak  $1 \text{ cm}^2$  alanda 5–10 arasında koloni varsa koloni sayacı kullanılarak yatay ve düşey olarak  $1 \text{ cm}^2$  olan 6'şar hatta sayım yapıp, ortalaması alınır ve Petri kutusu alanı ile orantı kurularak sayım sonucu hesaplanır.  $1 \text{ cm}^2$  alanda 10'dan fazla koloni varsa herhangi 4 alanda sayım yapıp, ortalama alınır ve yine Petri kutusu alanı ile oranlanarak sonuç bulunur. Her iki koşulda da sonuç "tahmin" olarak verilir. Koloni sayısının hesaplanmasında sıklıkla karşılaşılan bir soru, aynı seyreltiden 2 paralel ekim yapıldığında sayım sonuçları arasındaki farktır. Genel olarak; %0–10 farklılık "çok iyi", %10–15 farklılık "iyi" ve %15–20 farklılık "kabul edilebilir" olarak değerlendirilmektedir. Daha yüksek koloni sayısı farklılıkları görülüyor ise bunun nedenleri sistematik olarak araştırılmalı ve farkın aşağıya çekilmesi için düzeltici uygulama yapılmalıdır.

Burada dikkati çeken bir ayrıntı vardır. 2 paralel ekimde 80 ve 100 koloni sayımı elde edildi ise, tolerans hesabında hangi sayının dikkate alınacağı tartışılmalıdır. 80 koloni dikkate alınırsa, bunun %20 fazlası 96 olup, kabul edilebilir sınırın dışındadır. Oysa 100 koloni esas alınırsa, bunun %20 eksigi 80 olup, bu kez kabul edilebilir sınır içindedir. Analiz yapan kişinin lehine olarak büyük değer esas alınabileceği gibi, analiz sonucunun daha duyarlı olması açısından küçük değer de dikkate alınabilir. Bu konu, ilgili talimatta belirtilmelidir.

Sayımda dikkat edilmesi gereken bir diğer özellik, performans testidir ve ayda en az bir kez yapılması önerilir. Buna göre sayım yapan personelin aynı Petri kutusunda bir kez daha sayım yapması sağlanır. 2 sonuç arasında kabul edilebilecek en yüksek fark %8'dir. Aynı Petri kutusunda 2 ayrı personelin sayım sonuçları arasında ise, en çok %10 fark kabul



edilebilir. Bu şekilde personelde performans düşüklüğü fark edilirse, düzeltici önlem alınmalıdır.

## 7. Yeni mikrobiyolojik uygulamalar

### 3M PETRİFİMLER

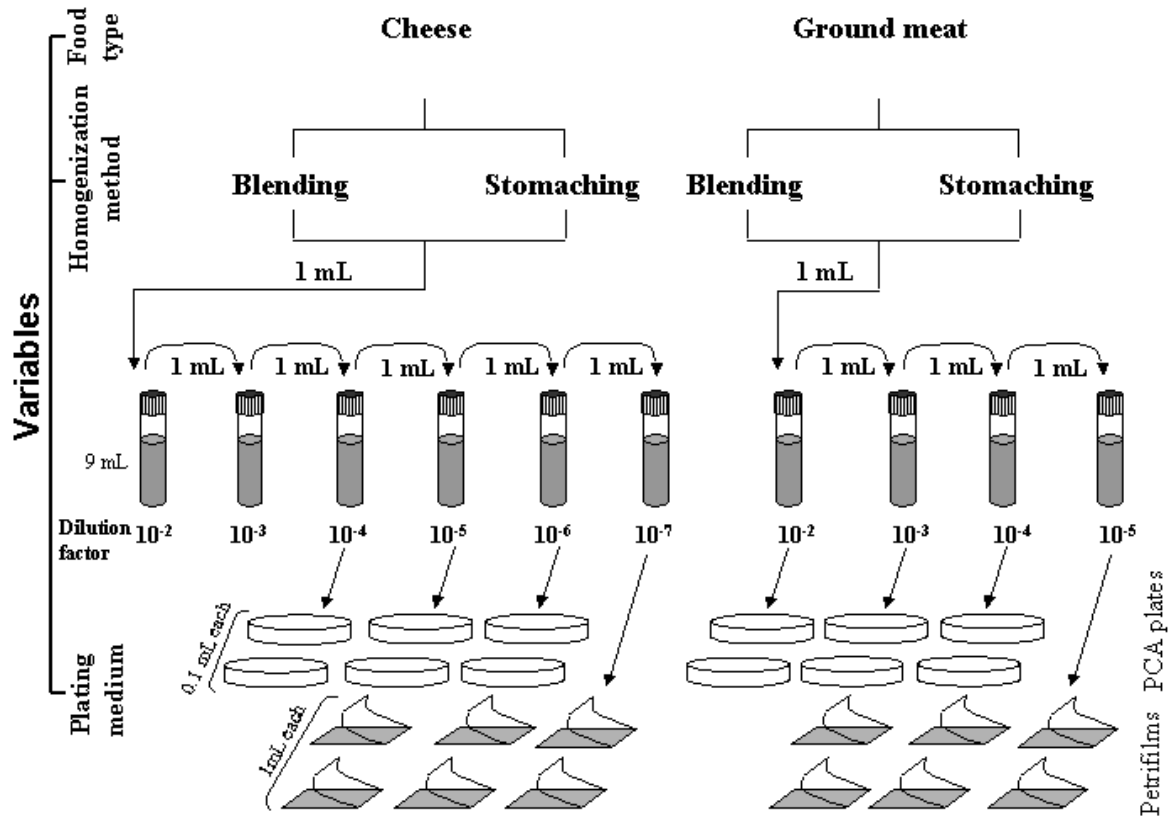
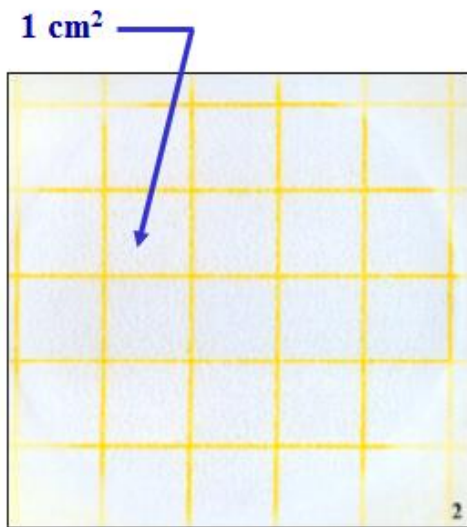


Fig. 2.2. Overall procedure used in the total plate count exercise

Food Micro-636, Spring

## Petrifilms



Petrifilm area: 20 cm<sup>2</sup>

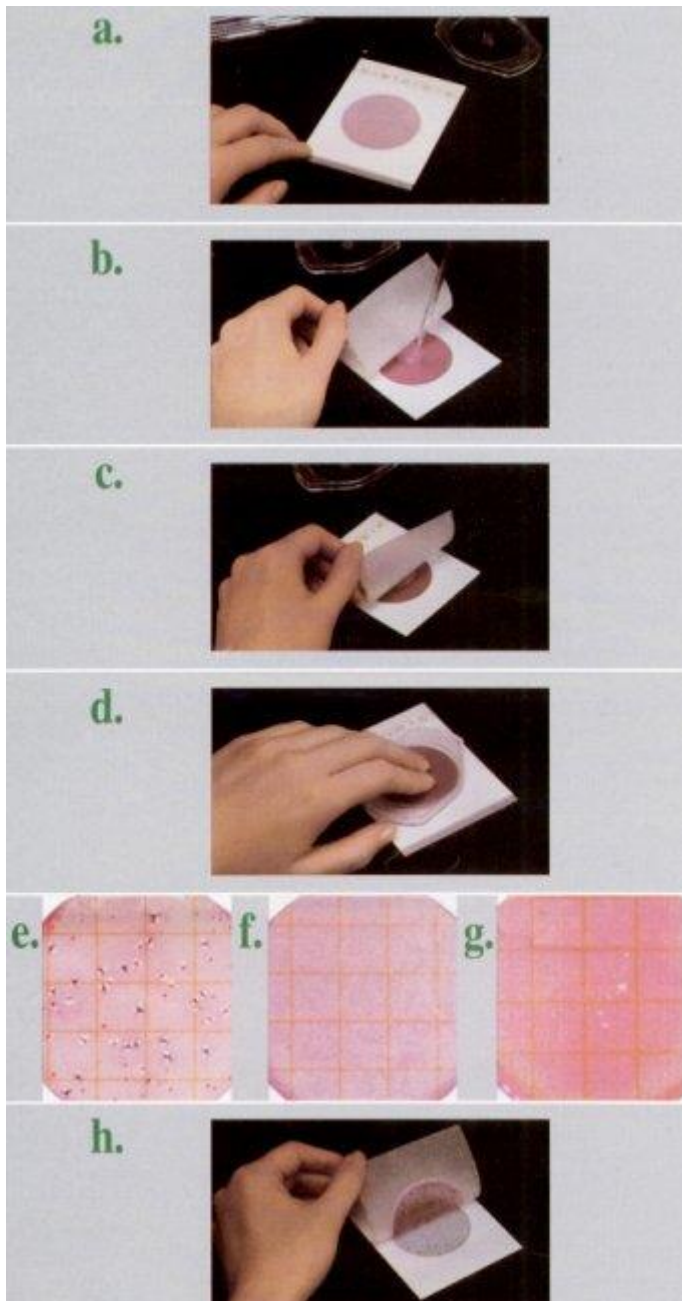
- Incorporate medium into membrane
- Contains nutrients, gelling agents, dye
- The TETRAZOLIUM dye is reduced by growing cells to produce a red color: all red dots of size should be counted as colonies

### **ADVANTAGES:**

- Quick
- Saves space

### **DISADVANTAGES:**

- Not possible to distinguish colony morphology
- Expensive



## 3M™ Petrifilm™ Sayım Plakaları – hızlı, kolay ve güvenilir



### Petrifilm™ Aerobik Sayım Plakası

- Aerobik Toplam Canlı Sayımı yapılmaktadır
- Kolonileri kırmızıya boyayan indikatör sayesinde yorumlama oldukça kolaydır



### Petrifilm™ Enterobacteriaceae Sayım Plakası

- Enterobacteriaceae Sayımı
- Koloniler tarafından üretilen asit, pH indikatörü sayesinde sarı renk almaktadır.
- Glükoz fermentasyonu sonucunda ortaya çıkan gaz, üst film sayesinde tutulur.



### Petrifilm™ Çevresel Listeria Sayım Plakası

- Çevre numunelerinde Listeria tayını için kullanılmaktadır. 26-30 saat içerisinde sonuç vermektedir.
- Ön zenginleştirme gerekmemektedir.



### Petrifilm™ Maya & Küf Sayım Plakası

- Maya ve küf kolonilerinin sayımı içindir.
- Antibiyotik ilavesi gerekmemektedir



### Petrifilm™ Hızlı Koliform Sayım Plakası

- Koliformların hızlı analizi için kullanılmaktadır.
- Çok hassas pH indikatörü çoğalan kolonilerin ürettiği asidi saptamaktadır.
- 6 saat içerisinde koliform kontaminasyonu ile ilgili bilgi vermektedir.



### Petrifilm™ Staph Express Sayım Plakası

- Staphylococcus Aureus Sayımı
- Bir veya iki aşamada analiz (ikinci aşamada DNase reaksiyonu).
- 24 - 27 saat içerisinde sonuç vermektedir



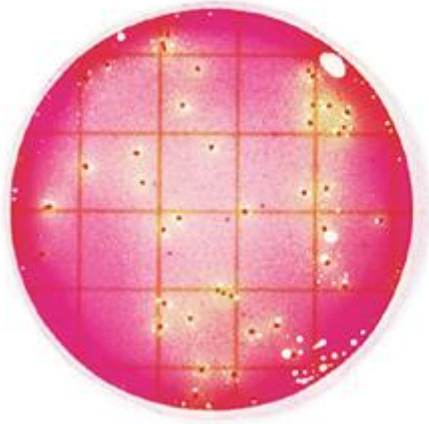
### Petrifilm™ E.coli Sayım Plakası

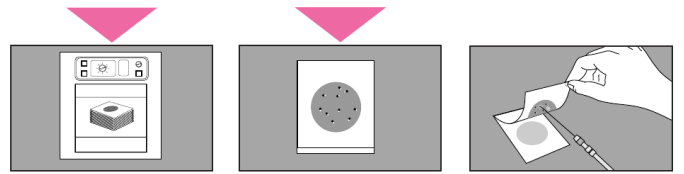
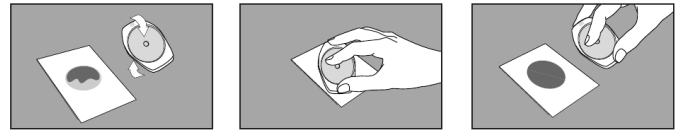
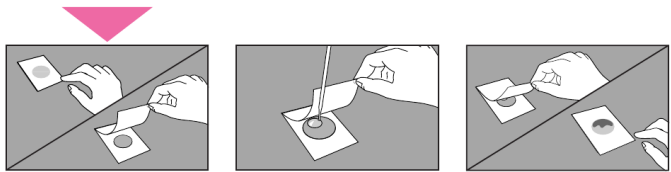
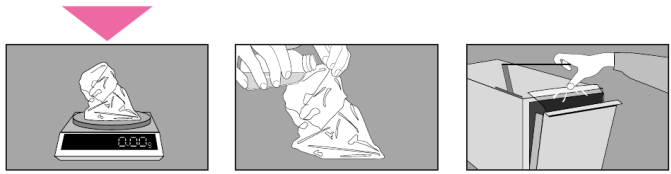
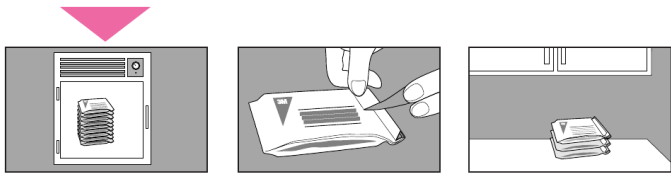
- Sadece E. coli kolonileri görünmektedir
- B-glükorodinez indikatörü içermektedir.
- 24 saatte sonuç vermektedir

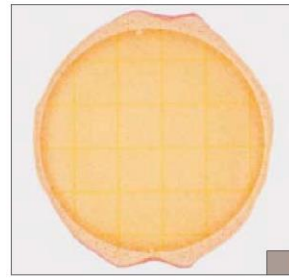
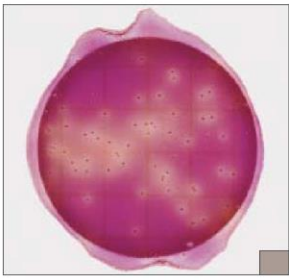
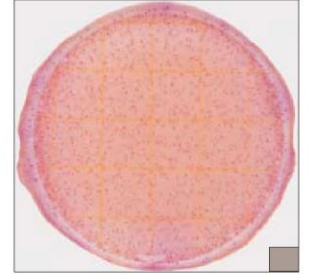
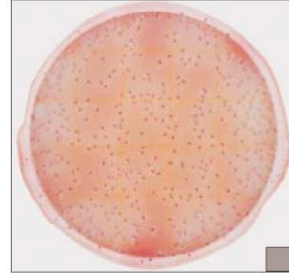
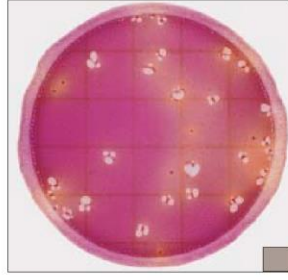
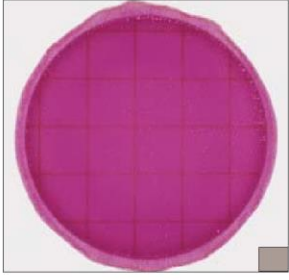


### Petrifilm™ Koliform Sayım Plakası

- Koliformların (toplam veya termotolerant) sayımı için kullanılır.
- Kolonilerin indikatör aracılığıyla kırmızıya boyanması sebebiyle, sayım işlemi oldukça kolaydır
- Üst film laktöz fermentasyonu sebebiyle ortaya çıkan gazı tutmaktadır







## API TESTİ

API Listeria stripinde enzimatik testler veya seker fermentasyonlarının performanslarını kullanan dehidrate substratlar içeren 10 mikrotüp mevcuttur. İnkübasyon esnasında, metabolizma kendiliğinden veya reaktiflerin ilavesi ile açıklanan renk değişimi meydana getirir. Reaksiyonlar okuma tablosuna göre okunur ve tanımlama prospektüsteki profil endeksine başvurularak veya tanımlama yazılımı kullanarak elde edilir.



listeria negatif



listeria positif

OKUMA TABLOSU

TESTLER	AKTİF İÇERİKLER	MİKTAR (mg/küp.)	REAKSİYONLAR	SONUÇLAR	
				NEGATİF	NEGATİF
[DIM]	Enzimatik substrat	0,106	<i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i> ayrımı	ZYM B / < 3 dakika açık turuncu pembe bej gri bej	
ESC	Esculin Ferric citrate	0,16 0,024	hidroliz (ESCulin)	Açık sarı	siyah
αMAN	4-nitrophenyl-αD-mannopyranoside	0,045	α-MANnosidase	renksiz	sarı
DARL	D-Arabitol	0,4	asidifikasyon (D-Arabitol)	kırmızı / turuncu - kırmızı	sarı / sarı-turuncu
XYL	D-Xylose	0,4	asidifikasyon (XYlose)		
RHA	L-Rhamnose	0,4	asidifikasyon (RHAMnose)		
MDG	Methyl-αD-glucopyranoside	0,4	asidifikasyon (Methyl-αD-Glucopyranoside)		
RIB	D-Ribose	0,4	asidifikasyon (RIBose)		
G1P	Glucose-1-Phosphate	0,4	asidifikasyon (Glucose-1-Phosphate)		
TAG	D-Tagatose	0,4	asidifikasyon (TAGatose)		

- Gösterilen miktarlar kullanılan ham malzemenin miktarına bağlı olarak ayarlanabilir.
- Bazı küpüller, özellikle peptonlar, hayvan kaynaklı ürünler içerir.



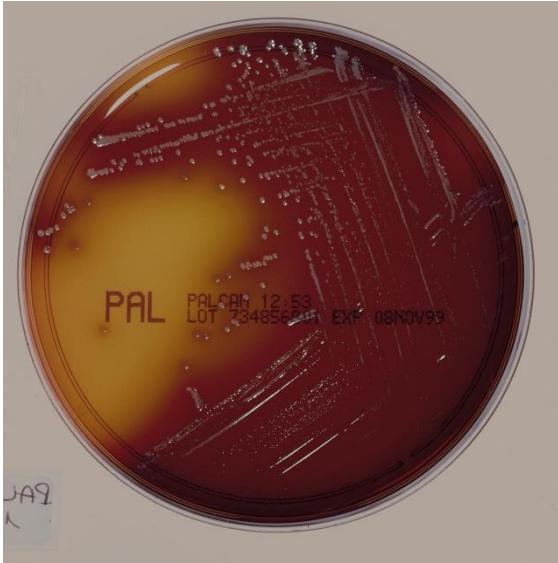
*L. monocytogenes*



*L. ivanovii*



*L. innocua*



*Listeria monocytogenes* (PALCAM)

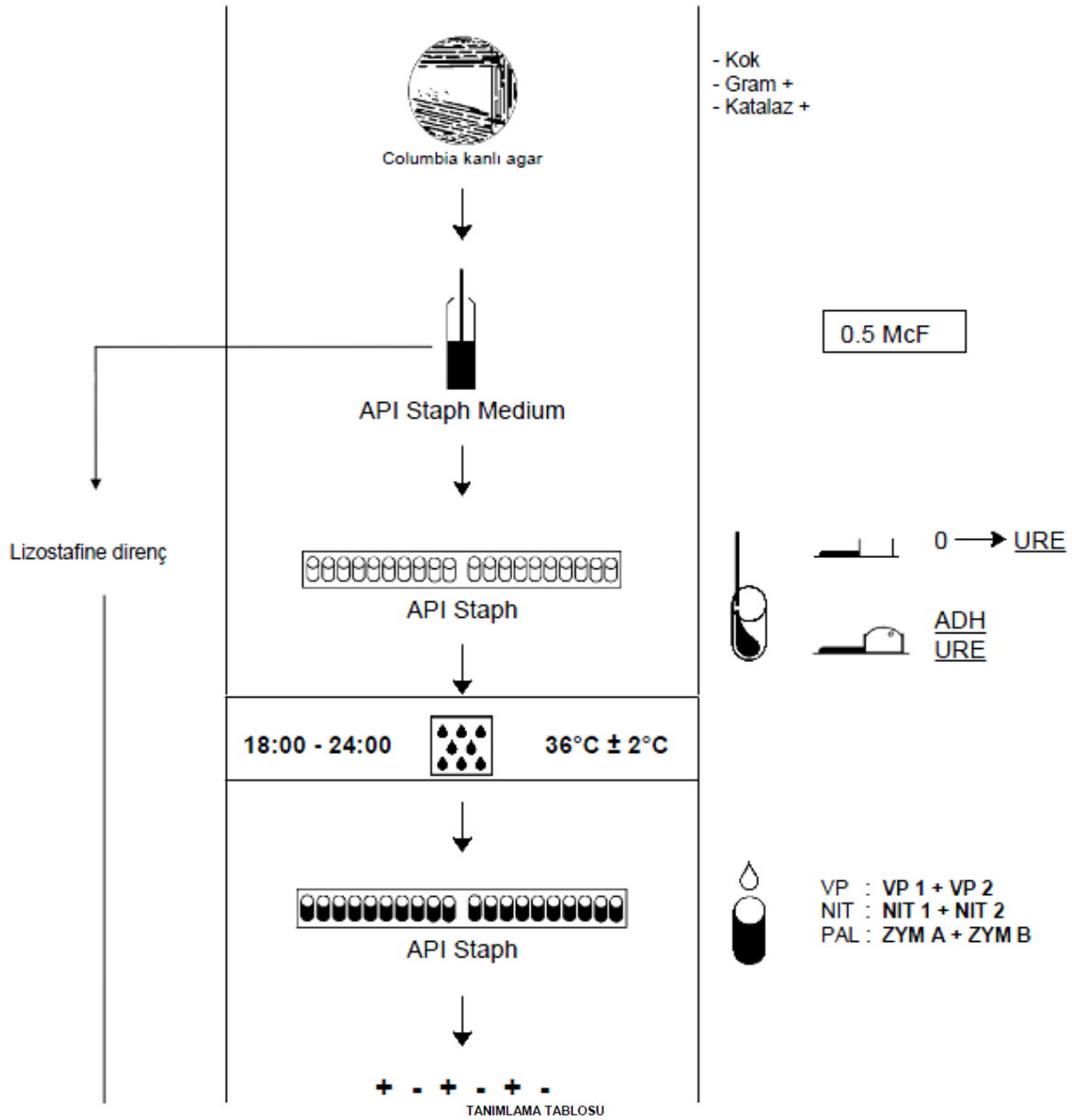


*L. monocytogenes* (%5 koyun kanlı agar)

Staph api



## METODOLOJİ



18-24 saat sonra 36°C ± 2°C'de % pozitif reaksiyon

API STAPH V4.0	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	61	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0
<i>Staphylococcus cohnii ssp. cohnii</i>	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0
<i>Staph. cohnii ssp. urealyticum</i>	0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	18	99	0	0	100	0	90	1	50	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	18	90	0	0	99	0	6	77	97	0
<i>Staphylococcus xylosum</i>	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
<i>Kocuria kristinae</i>	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
<i>Kocuria varians/rosea</i>	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95
<i>Micrococcus spp</i>	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91



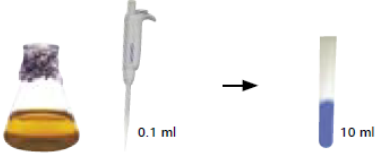



neg



positive

## Hızlı test kitleri

Singlepath Salmonella Test Kiti Uygulama Şeması	
	25 g (mL) gıda 225 mL TPS besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	İnkübasyon: 37 °C 'da 18±2 saat
	TPS kültüründen 0,1 mL alınıp 10 mL RVS Broth besiyerine aktarılır.
	İnkübasyon: 41,5 °C 'da 24±3 saat

	<p>RVS kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.</p>
	<p>Oda sıcaklığına getirilir.</p>
	<p>Singlepath Salmonella kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.</p>
	<p>20 dakika beklenir</p>
	<p>Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>Salmonella</i> pozitif, olmazsa <i>Salmonella</i> negatif olarak değerlendirilir.</p>
	<p>Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika</p>
	<p>Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.</p>

